

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ OLGULARINDA İLİŞKİLİ
TÜMÖR SÜPRESÖR GENLERİN METİLASYON
VE EKSPRESYON DURUMLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

YALIN KILIÇ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2012

DEU.HSI.PhD-2002970073

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ OLGULARINDA İLİŞKİLİ
TÜMÖR SÜPRESÖR GENLERİN METİLASYON
VE EKSPRESYON DURUMLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
DOKTORA TEZİ**

YALIN KILIÇ

Prof. Dr. MERAL SAKIZLI
(Danışman)

DEU.HSI.PhD-2002970073

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Doktora programı öğrencisi Yalın Kılıç, “**Meme Kanseri Olgularında İlişkili Tümör Süpresör Genlerin Metilasyon Ve Ekspresyon Durumlarının Karşılaştırılması**” konulu Doktora/~~Yüksek Lisans~~ tezini 26 Aralık 2012 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN

Prof. Dr. Meral SAKIZLI
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

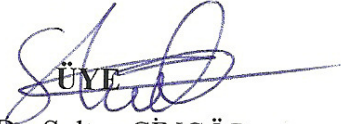


ÜYE

Prof. Dr. Tülay CANDA
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı


ÜYE

Doç. Dr. Esra ERDAL
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
GİRMEDİ



ÜYE

Doç. Dr. Sultan CİNGÖZ
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



ÜYE

Doç. Dr. Zuhale EROĞLU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



ÜYE (yedek)

Doç. Dr. Buket KOSOVA
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÜYE (yedek)

Doç. Dr. Sefa KIZILDAĞ
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
GİRMEDİ

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL DİZİNİ	vii
TABLO DİZİNİ	ix
KISALTMALAR	x
ÖZET	1
ABSTRACT	3
I. GİRİŞ VE AMAÇ	5
II. GENEL BİLGİLER	8
1. MEME	8
1.1. Memenin Anatomisi	8
1.2. Meme Dokusunun Biyolojik Özellikleri	9
1.3. Meme Dokusu Epitel Hücre Organizasyonu	9
2. MEME KANSERİ	10
2.1. Karsinogenez	10
2.2. Meme Kanseri Gelişimi	13
2.3. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi	15
2.4. Meme Kanserinde Risk Faktörleri	18
2.5. Meme Kanserinin Histolojik Tipleri	21
2.6. Meme Kanserinde Prognostik ve Prediktif Faktörler	22
3. EVRELEME	25
3.1. Kanserde Evreleme	25
3.2. Meme Kanseri TNM Evrelemesi	25
3.2.1. Primer Tümör (T)	26
3.2.2. Bölgesel Lenf Nodülleri (N)	27
3.2.2.1. Klinik Sınıflama	27
3.2.2.2. Patolojik Sınıflama (pN)a	28
3.2.3. Uzak Metastaz (M)	29
3.2.4. Histopatolojik Grade (G)	30
3.2.5. Rezidüel Tümör (R)	30
3.3. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması	30

4. TÜMÖR SÜPRESÖR GENLER	32
4.1. Tümör Süpresör Kavramı	32
4.2. ATM	32
4.3. BRCA1	33
4.4. BRCA2	33
4.5. CASP8	33
4.6. CD44.....	34
4.7. CDH13.....	34
4.8. CDKN2A.....	35
4.9. CDKN2B	35
4.10. ESR1	36
4.11. GSTP1	36
4.12. MGMT.....	36
4.13. MLH1	37
4.14. MSH6	37
4.15. PAX5	38
4.16. PAX6.....	39
4.17. PTEN	39
4.18. RARB	40
4.19. RASSF1	40
4.20. STK11.....	41
4.21. THBS1	41
4.22. TIMP3.....	42
4.23. TP53	42
4.24. TP73	43
5. GEN EKSPRESYONU	44
5.1. Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz-PCR (<i>Real time</i> RT-PCR)	45
5.1.1. Mikrokolon ile RNA izolasyonu.....	45
5.1.2. Abzorbans ve RNA miktarı ile saflığının belirlenmesi	45
5.1.3. Komplementer DNA sentezi.....	46
5.1.4. FRET ve Floresan Proplar	46

5.1.5. UPL (Universal ProbeLibrary™)	47
5.1.6. PCR reaksiyon dinamiği ve Ct kavramı	48
5.1.7. Reaksiyon verimliliği belirteci (R^2)	48
5.2. PCR verilerinin Kantitasyonu	49
5.3. Referans Genlerin Belirlenmesi ve Normalizasyon	51
5.4. Ekspresyon Isı haritası (heatmap)	53
6. EPİGENETİK	54
6.1. DNA Hipermetilasyonu	54
6.2. Metilasyon MLPA	55
6.2.1. MLPA Reaksiyonu	55
6.2.2. Fragman Separasyonu	58
6.2.3. Fragman Analizi Parametreleri	58
6.2.3.1. Boy Standardı Düzeltmesi	58
6.2.3.2. Rölatif Pik Eşiiği	58
6.2.3.3. Eğim Eşiiği	59
6.2.3.4. Mobilite/Süre Parametresi	59
6.2.3.5. Floresan Pik Büyüklükleri	59
6.2.3.6. Boya Mobilite Düzeltmesi	59
7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	60
7.1. Parametrik ve Parametrik Olmayan Analizler	60
7.2. Varyans Analizi (ANOVA)	60
7.3. Korelasyon Analizi ve Ağ Şeması	61
7.4. Çok Değişkenli Karşılaştırma Testleri	62
7.5. Mann Whitney U testi	62
7.6. Ki-Kare Testi	62
7.7. Kruskal-Wallis Testi	62
7.8. Kümeleme Analizi ve Dendrogramlar	63
8. MEME KANSERİNDE MOLEKÜLER PROGNOSTİK VE PREDİKTİF TESTLER	64
8.1. Vücut Dışı Çok Değişken İçerikli Tanı Testleri	64
8.2. H/I Endeksi	65
8.3. Oncotype DX	65

8.4. MammaPrint	66
8.5. Vücut Dışı Çok Değişken İçerikli Tanı Testlerinin Güncel Durumu.....	67
III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	68
1. ARAŞTIRMANIN TİPİ.....	68
2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI.....	68
3. ARAŞTIRMANIN EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ	68
4. ÇALIŞMA MATERYALİ	69
5. ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ.....	69
6. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI	70
6.1. DEÜ Meme Tümör Biyobankası.....	70
6.2. Demografik Veriler	70
6.3. İncelenen Genler.....	71
6.4. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	72
6.4.1. RNA İzolasyonu	72
6.4.1.1. Trizol ile RNA izolasyonu:.....	73
6.4.1.2. RNA miktarının ve saflığının belirlenmesi.....	74
6.4.1.3. Mikrokolon Yöntemi ile RNA izolasyonu	74
6.4.2. Komplementer DNA sentezi.....	75
6.4.3. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi İşlemlerinin Kontrolü.....	76
6.4.4. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR	77
6.4.5. Primer Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	79
6.4.6. Sıcaklık Profili (Termal Profil)	81
6.4.7. Standart Eğri ve PCR Verimliliği.....	81
6.4.7. Çalışma İçi Kontroller ve Çalışmalar Arası Varyasyon	82
6.4.8. Normalizasyon.....	83
6.4.8.1. Referans Genlerin Belirlenmesi.....	83
6.4.8.2. Rölatif Gen kantitasyonu	83
6.4.9. Kantitatif Ekspresyon Skorlarının Kategorizasyonu.....	83
6.4.10. Normalize Sonuçların Görselleştirilmesi	83
6.5. Gen Promotor Bölgeleri Metilasyon Durumlarının Belirlenmesi	84
6.5.1. DNA İzolasyonu.....	84

6.5.2. Metilasyon MLPA.....	84
6.5.3. SALSAs PCR Etkinliğinin PAGE ile Kontrolü.....	90
6.5.4. PCR Ürünlerinin Ayrımı.....	91
6.5.5. Fragman Analizi.....	92
6.5.6. MLPA Normalizasyonu ve Metile Piklerin Değerlendirilmesi.....	96
6.5.7. Normalize Sonuçların Gørselleřtirilmesi	98
7. ARAşTIRMA PLANI VE TAKVİMİ	99
8. VERİLERİN DEğerLENDİRİLMESİ	100
8.1. Demografik Verilerin Kategorizasyonu	100
8.2. Deneysel Varyasyonların Belirlenmesi	100
8.3. RT-PCR ve MLPA Verilerinin Demografik Gruplara Göre İncelenmesi.....	101
8.4. RT-PCR ve MLPA Verilerinin Kendi İçlerinde İncelenmesi	101
8.5. RT-PCR ve MLPA Verilerinin Birbirlerine Göre İncelenmesi.....	101
8.6. Kùmeleme Analizi ve Dendrogramlar.....	102
9. ÇALIşMANIN SINIRLILIKLARI.....	103
9.1. Çalışma İçi Kontrol ve Tekrarlar.....	103
9.2. Çalışma Dışı Bırakılan Örnekle ve Testler	103
9.3. Örnekleme büyüklüğü	104
10. ETİK KURUL ONAYI.....	105
IV. BULGULAR	106
1. OLGULAR	106
2. GERÇEK ZAMANLI PCR (<i>REAL TIME PCR</i>) ÇALIşMALARI	108
2.1. RNA miktarı ve saflığı	108
2.2. Primer Optimizasyonu.....	108
2.3. Referans Genler	110
2.4. Standart Eğriler ve Amplifikasyon Verimleri	111
2.5. Gen Ekspresyonu Verileri (Normalize RT-PCR Sonuçları)	113
2.6. Çalışma içi kontroller ve çalışmalar arası varyasyon	113
2.7. Gen Ekspresyonundaki Değişiklikler	114
2.8. Gen Ekspresyonu Isı Haritası (<i>HeatMap</i>)	114

2.9. PCR Verileri Arasında Korelasyonlar	119
3. METİLYASYON MLPA ÇALIŞMALARI.....	122
3.1. DNA izolasyonu	122
3.2. PAGE ile MLPA Amplifikasyon Kontrolü	122
3.3. MLPA PCR Ürünlerinin Fragman Ayırıştırması.....	122
3.4. Fragman Analizi	124
3.5. MLPA Metilasyon Beta Skorları.....	125
3.6. Metilasyon Durumunda Değişiklikler	125
3.7. Metilasyon Isı Haritası (Heatmap)	126
3.7. MLPA Verileri Arasında Korelasyonlar	129
4. QRT-PCR VE mMLPA VERİLERİ İLE DEMOGRAFİK VERİLER ARASINDAKİ İLİŞKİLER....	134
4.1. PCR Verileri ile Demografik Veriler Arasındaki İlişkiler	134
5. GERÇEK ZAMANLI PCR VE METİLYASYON MLPA ARASINDAKİ İLİŞKİLER.....	138
5.1. Metilasyon durumunun ekspresyon durumu ile ilişkisi.....	138
5.2. Ekspresyon durumunun metilasyon durumu ile ilişkisi	139
V. TARTIŞMA.....	142
1. ANALİZ TEKNİKLERİNE YAKLAŞIM	142
1.1. Gerçek zamanlı RT-PCR ile Kantitasyon.....	142
1.2. Gerçek zamanlı PCR’da kalitatif değerlendirme.....	143
1.3. MLPA da yanlış pozitifliğin değerlendirilmesi	144
2. GEN EKSPRESYONU DEĞİŞİKLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	145
3. METİLYASYON DURUMLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	148
4. EKSPRESYON DEĞİŞİKLİKLERİNİN METİLYASYON İLE İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	150
5. GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN PREDİKTİF VE PROGNOTİK FAKTÖRLERE ETKİSİ.....	151
6. METİLYASYON DURUMLARININ PREDİKTİF VE PROGNOTİK FAKTÖRLERE ETKİSİ	154
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER	156
VII. KAYNAKLAR	158
VIII. EKLER.....	202

SEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Memenin anatomisi	8
Şekil 2. Meme epitelinin hücresel yapısı	9
Şekil 3. Kanser hücresinin kazanımları	10
Şekil 4. Hücre siklüsü	12
Şekil 5. Meme kanserinin ilerleyişi	13
Şekil 6. Meme kök hücresi ve olası progenitör hücreler	14
Şekil 7. Dünyada meme kanseri insidansı oranları.....	15
Şekil 8. Ülkeler arasında meme kanser ölüm oranları.....	17
Şekil 9. DNA <i>mismatch</i> (yanlış eşleşme) tamirinde görev alan temel proteinler.....	38
Şekil 10. DNA'dan proteine bilgi aktarımı.....	44
Şekil 11. FRET prensibi ile çalışan bir probun şematik gösterimi	47
Şekil 12. Şematik olarak qRT-PCR reaksiyonu verisi.....	48
Şekil 13. Örneklerin dağılımına göre R^2 'nin durumu	49
Şekil 14. Kanserde gen ekspresyon çalışmalarında ısı haritası gösterimi	53
Şekil 15. DNA metilasyonunun şematik gösterimi	54
Şekil 16. MLPA reaksiyonlarının şematik gösterimi	56
Şekil 17. MLPA probunun yapısı ve amplifikasyonunun şematik gösterimi	57
Şekil 18. HhaI restriksiyon enziminin fonksiyonu	57
Şekil 19. Korelasyon analizinde ağ şeması gösterimi	61
Şekil 20. Dendrogram yapısı	63
Şekil 21. Elde edilen RNA'ların kontrolü.	77
Şekil 22. PCR sıcaklık profili	81
Şekil 23. Deney sırasında örneklerin plak üzerindeki yerleşim örnekleri	82
Şekil 24. Elektroforez parametreleri	92
Şekil 25. Fragman analizi parametreleri	93
Şekil 26. ME001 testi için MLPA sonrası fragman analizi yöntemi	95
Şekil 27. ME002 testi için MLPA sonrası fragman analizi yöntemi	96

Şekil 28. Metilasyon miktarını belirlemede kullanılan pik normalizasyonu algoritması	97
Şekil 29. ACTB geni için normal ölçekli ve logaritmik amplifikasyon grafikleri	108
Şekil 30. Aday referans genlerin meme dokusunda ekspresyon seviyeleri.....	110
Şekil 31. Aday referans genlerin doku grubuna göre ekspresyon seviyeleri.....	110
Şekil 32. Genorm ile aday referans genlerin ekspresyon stabiliteleri.....	111
Şekil 33. Standart eğri örnekleri: ACTB ve B2M genlerinin standart eğrileri	112
Şekil 34. Gen ekspresyonu değerlerinin kutu grafiği ile gösterimi	113
Şekil 35. Gen ekspresyonunu gösterir ısı haritası (<i>Heatmap</i>)	118
Şekil 36. qRT-PCR verisinin dendogramı ve ısı haritası.....	119
Şekil 37. qRT-PCR verileri ile gerçekleştirilen korelasyon analizini gösteren gen ağı.	121
Şekil 38. MLPA PCR ürünlerinin PAGE jel görüntüsü.	122
Şekil 39. Kapiller elektroforez ayırıştırma voltajı	122
Şekil 40. Kapiller elektroforez enjeksiyon ve ayırıştırma akımları	123
Şekil 41. Örnek bir ham veri.....	123
Şekil 42. Local Southern ile fragman büyüklüğü standart eğrisi hesabı	124
Şekil 43. Örnek bir fragman analizi sonrası veri görüntüsü	124
Şekil 45. Gen promotör bölgesinde hipermetilasyon gösteren bireyler	126
Şekil 46. Hipermetilasyon durumunu gösteren sıcaklık haritası	128
Şekil 47. Hipermetilasyon durumunu gösteren yarı kantitatif sıcaklık haritası.....	129
Şekil 48. ME001 MLPA verisinin dendogramı ve ısı haritası.....	130
Şekil 49. ME002 MLPA verisinin dendogramı ve ısı haritası.....	131
Şekil 50. ME001 MLPA verileri korelasyon sonuçlarını gösteren gen ağı.	132
Şekil 51. ME002 MLPA verileri korelasyon sonuçlarını gösteren gen ağı.	133
Şekil 52. PCR Verilerinde multivaryat karşılaştırma sonuçları ve dendrogramlar	135
Şekil 53. mMLPA-ME001 multivaryat analiz sonuçları ve dendrogramlar.....	137

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Dünyada yeni tanı alan kanser vakaları ve ölüm oranları, 2007	16
Tablo 2. Kadınlarda göğüs kanseri risk faktörleri	19
Tablo 3. Meme kanseri histolojik tipleri: WHO sınıflaması	23
Tablo 4. Meme kanseri prognostik ve prediktif faktörler	24
Tablo 5. Meme tümör evreleri	26
Tablo 6. PCR için Kullanılan Primer ve Prop Listesi.....	78
Tablo 7. Optimizasyon deneyinde 9 farklı primer konsantrasyonu.....	79
Tablo 8. Dokuz farklı primer konsantrasyonu için reaksiyon karışımları.....	80
Tablo 9. ME001 ve ME002 kitleri için gözlenmesi beklenen prop büyüklükleri	94
Tablo 10. Olguların Histolojik Olarak Gruplandırılması	106
Tablo 11. Olguların evrelere göre gruplandırılması	107
Tablo 12. Olguların invazyon durumuna göre gruplandırılması	107
Tablo 13. ACTB geni için farklı konsantrasyonlardaki Ct değerleri.....	109
Tablo 14. NormFinder ile aday referans gen sıralaması.....	111
Tablo 15. Standart eğrilerden elde edilen gen amplifikasyon verimlilikleri	112
Tablo 16. Doku bazında ekspresyon değişikliği oranları	114
Tablo 17. Gen ekspresyonu normal meme dokusuna göre değişmiş olan bireyler	115
Tablo 18. Gen bazında ekspresyon değişikliklerinin sıklığı.....	116
Tablo 19. Gen bazında ortalama ekspresyon değişiklikleri (kat olarak)	117
Tablo 20. Ekspresyon değişiklikleri arasında güçlü korelasyon olan genler (<i>r</i> değerleri) .	120
Tablo 21. Doku bazında hipermetilasyon durumları	125
Tablo 22. Aynı gene ait birden fazla bölge çalışılan durumlarda metilasyon bulguları	127
Tablo 23. Metilasyon durumları arasında güçlü korelasyon olan genler (<i>r</i> değerleri)	132
Tablo 24. PCR verilerinde anlamlı derecede farklı gruplar ve p değerleri.....	134
Tablo 26. Hipermetilasyon varlığında ilgili genin ekspresyonu durumları	138
Tablo 27. Gen ekspresyonunun azalmış olduğu koşullarda hipermetilasyon durumu	140
Tablo 28. Gen ekspresyonunun artmış olduğu koşullarda hipermetilasyon durumu	141

KISALTMALAR

A	Absorbance	Abzorbans
ACS	American Cancer Society	Amerikan Kanser Topluluğu
ACTB	Beta Actin	Beta Aktin
AJCC	American Joint Committee On Cancer	Amerika Kanser Birleşik Komitesi
APC	Adenomatous Polyposis Coli	Adenomatöz Polipoz Kolon
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated	Ataksi Telanjijektazi Mutant
B2M	Beta 2 Microglobulin	Beta 2 Mikroglobülin
BASC	Bra1 Associated Genome Surveillance Complex	Bra1 İlişkili Genom Sağkalım Kompleksi
BRCA1	Breast Carcinoma 1	Meme Kanseri 1
BRCA2	Breast Carcinoma 2	Meme Kanseri 2
CARD	C-terminal caspase-recruitment domain	Karboksi Ucu Kaspaz Çalıştırma Bölgesi
CASP8	Caspase 8	Kaspaz 8
CASR	Calcium-Sensing Receptor	Kalsiyum Hisseden Reseptör
CD44	Cluster Of Differentiation 44	Diferansiyon Kümesi 44
CDH13	Cadherin 13	Katerin 13
CDKN1	Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 1B/ p27 ^{kip1}	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase İnhibitor 2a	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2a
CDKN2B	Cyclin Dependent Kinase İnhibitor 2b	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2b
CHFR	Checkpoint With Fork-Head Associated And Ring Finger	Çatal Kafa İlişkili Kontrol Noktası Ve Çinko Parmak
CLIA	Clinical Laboratory Improvement Amendments	Klinik Laboratuvar Geliştirme Yasa Değişikliği
CpG	Ctyosine-Phosphatidyl-Guanosin	Sitozin Fosfatidil Guanidin

CREM	Camp-Responsive Element Modulator	Siklik AMP Cevap Bileşeni Modülatörü
DAPK1	Death-Associated Protein Kinase 1	Ölüm İlişkili Protein Kinaz
DEMTB	Dokuz Eylül Üniversitesi Meme Tümörü Biyobankası	
EGF	Epidermal Growth Factor	Epidermal Büyüme Faktörü
ER	Estrogen Receptor	Östrojen Reseptörü
ESR1	Estrogen Receptor 1	Östrojen Reseptörü 1
FDA	Food And Drug Administration	Amerikan Gıda Ve İlaç Kurumu
FHIT	Fragile Histidine Triad Protein	Kırılgan Histidin Üçlü Protein
FRET	Förster Resonance Energy Transfer	Förster Rezonansı Enerji Transferi
G0	Gap0	Bekleme 0
G1	Gap1	Bekleme 1
GF	Growth Factor	Büyüme Faktörü
GSTP1	Glutathione S-Transferase	Glutasyon S-Transferaz
HCELL	Hematopoietic Cell E-Selectin/L-Selectin Ligand	Hematopoetik Hücre E-Selektin/L-Selektin Ligand
HER2	Human Epithelial Growth Factor	İnsan Epitel Büyüme Faktörü
HIC1	Hypermethylated İn Cancer 1	Kanserde Hipermetillenmiş 1
HRT	Hormone Replacement Therapy	Hormon Replasman Tedavisi
IGSF4	Immunoglobulin Superfamily, Member 4	İmüno globin süper ailesi 4. üyesi
İHK	İmünohistokimya	
IL2	Interleukin 2	İnterlökin 2
İTH	İzole Tümör Hücreleri	
IVDMVIA	In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays	Vücut Dışı Çok Değişken Endeksli Tanı Testleri
LDL	Low Density Lipoproteins	Düşük Yoğunluktaki Lipoproteinler
LNA	Locked Nucleic Acid	Kilitli Nükleik Asit

M	Metastasis	Uzak Bölgelere Yayılım
MANOVA	Multivariate Analysis Of Variance	Multivaryat Varyans Analizi
MAPK	Mitogen-Activated Protein	Mitojen İle Aktiflenen Protein
MGMT	Methylguanine-DNA Methyltransferase	Metilguanin DNA metil transferaz
MLH1	MutL Homolog 1	MutL homoloğu 1
MLH3	MutL Homolog 3	MutL homoloğu 3
MLPA	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification	Multipleks Ligasyon-Bağımlı Prob Amplifikasyon
mMLPA	Methylation Specific Multiplex Ligated Probe Amplification	Metilasyona Özgün Çoklu Bağlanmış Prop Amplifikasyonu
MMuLVRT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase	Moloney Mürin Lösemi Virüsü Ters Transkriptazı
MSH6	MutS Homolog 6	MutS homoloğu 6
N	Node	Aksiller Lenf Nodlarına Yayılım
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome 1	Nijmegen Kırılma Sendromu
NO	Nitrous-Oxide	Nitröz-Oksit
P	Probability	Olasılık
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	Poli-Akrilamid Jel Elektroforezi
PAH	Phenylalanine Hydroxylase	Fenilalanin Hidroksilaz
PARK2	Parkinson Protein 2	Parkinson Protein 2
PAX5	Paired Box 5	İkili Kutu 5
PAX6	Paired Box 6	İkili Kutu 6
PgR	Progesterone Receptor	Projesteron Reseptörü
PMP22	Peripheral Myelin Protein 22	Periferel Miyelin Protein 22
PTCH	Patched Homolog	<i>Patched</i> Homoloğu
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog	Fosfat Ve Tensin Homoloğu
PUM1	Drosophila Pumilia Homolog 1	Drozofila <i>Pumilia</i> Homoloğu
PYCARD	PYD and CARD domain containing	PYD ve CARD Bölgesi İçeren
PYD	Pyrin-Paad-Dapin	Pirin-Paad-Dapin

qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction	Kantitatif Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Raf	Ras-Activated Factor	Ras ile Aktiflenen Faktör
RARB	Retinoic Acid Receptor-Beta	Retinoik Asit Reseptörü-Beta
Ras	Rat Sarcoma	Sıçan Sarkoma
RASSF1	Ras-Association Domain Family 1	Ras Birleşme Bölgesi Ailesi 1
RPL13A	Ribosomal Protein 13a	Ribozomal Protein 13a
RPLP0	Ribosomal Protein Large P0	Ribozomal Protein
RT-PCR	Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction	Ters Transkriptaz-PCR
S	Synthesis	Sentez
Ser	Serine	Serin
SOS	Son Of Sevenless Protein	<i>Sevenless</i> Proteininin oğlu
STK11	Serine/Threonine Kinase 11	Serin Treonin Kinaz 11
T	Tumor Size	Tümör Boyutu
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>	<i>Thermus Aquaticus</i>
TBP	Tata Binding Protein	Tata Bağlayıcı Protein
THBS1	Thrombospondin 1	Trombospondin 1
Thr	Threonine	Treonin
TIMP3	Tissue Inhibitor Of Matrix Metalloproteinases 3	Matris Metalloproteinazlarının Doku İnhibitoru 3
TNM	Tumor Staging System	Tümör Evrelendirme Sistemi
TNXB	Tenascin XB	Tenaskin XB
TP53	Tumor Protein 53	Tümör Protein 53
TP73	Tumor Protein 73	Tümör Protein 73
TSC2	Tuberous Sclerosis 2	Tüberöz Skleröz 2
UPL	Universal Probe Library	Evrensel Prop Kütüphanesi
WHO	World Health Organization	Dünya Sağlık Örgütü

Sevgili Özlem'e...

MEME KANSERİ OLGULARINDA İLİŞKİLİ TÜMÖR SÜPRESÖR GENLERİN METİLASYON VE EKSPRESYON DURUMLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Yalın Kılıç, Tıp Fakültesi, yalin.kilic@deu.edu.tr

ÖZET

Amaç: Bireysel tedavi modalitelerinin giderek ön plana çıktığı yeni çağda, genetik temel üzerinde gelişen kanserin sınıflandırmasının moleküler düzeyde yapılmasının önemi kabul görürken, hasta tümör örneklerinin genetik ve epigenetik durumlarının incelenmesi hastalık hakkında tanı, tedavi ve prognoz ile ilişkili detayların bilinmesine yol açacaktır.

Yöntem: Tümör süpresör gen olarak kabul gören 23 genin invazif meme tümörü dokusundaki ekspresyon düzeyleri ile bu genlerin promotor bölgelerinin metilasyon durumlarını inceleyerek, meme tümörünün histopatolojik prognostik bulguları ve hastaların bazı demografik bilgileri ile ilişkisi değerlendirdik. Ekspresyon çalışmaları için qRT-PCR, epigenetik çalışmalar için ise mMLPA yöntemini kullandık.

Bulgular: Meme tümörlerinde, sağlıklı normal bireylere kıyasla her bir hastada ortalama olarak incelenen içerisinde %38'inin ekspresyonunda azalma, %47'sininde artma olduğu; komşu normal dokuların ekspresyon profillerinin normal dokulardan farklı olduğu, her hastada en azından 17 genin ekspresyonunun gen başına ortalama 17,1 kat değiştiği görüldü. Aynı genlerin promotor bölgelerinde ise hasta başına ortalama %14 gende hipermetilasyon saptandı. Komşu normal dokularda da daha nadiren ve düşük oranda ve metilasyon gözlenirken, sağlıklı normal dokularda gözlenmedi. En büyük oranda ekspresyon değişiklikleri azalma ve artma yönüne sırasıyla ESR1 ve TP53'de izlendi. En sık metile olan gen ise RASSF1 idi. RASSF1, TIMP3, CDH13 ve ESR1 ekspresyonlarındaki azalma sıklıkla birliktelik gösterirken, CDH13 azalırken CD44'ün anlamlı bir ilişki ile arttığı gözlemlendi. BRCA1'de gözlenen azalmanın ve CD44 ile BRCA2'deki artmanın uzak metastaz ile; ESR1 ve CDH1'deki azalma ile CD44'ün artışının hormonal tedaviye yanıtızlık, artmış mitotik aktivite ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu görüldü. ER ve HER2 negatif tümörlerde ESR1'in azaldığı ve CD44'ün arttığı gözlemlendi. ESR1 ekspresyonunun ayrıca duktal tip tümörlerde

belirgin derecede azalırken, mikt tip tümörlerde değişmediği görüldü. Gen ekspresyonunun azalmasının, BRCA1 geni için promotor bölgesinde metilasyon varlığı ile ilişkilendirilmesi mümkün oldu. Diğer genler için böyle bir ilişki saptanamadı.

Sonuç: Moleküler analizlerin meme kanserinin karakteri hakkında bilgi verici olduğu açıktır. Ancak hiç şüphe yok ki, daha güçlü istatistiksel sonuçları elde etmek için veri madenciliği olarak isimlendirilen, kümeleme ve çok değişkenli regresyon hesaplamalarının kombinasyonundan oluşan ileri istatistiksel analizlerin uygulanabileceği geniş hasta grupları ile çalışmalar yapılması son derece önemlidir. Bu sebeple, geniş gruplar ile çok değerli çalışmaların hızlı ve güvenilir şekilde yapılmasına imkan sağlayacak tümör biyobankalarının oluşturulması ve devamlılığının sağlanması öncelikli hedeflerden olmalıdır.

Anahtar Kelimeler: meme kanseri, q-RT-PCR, m-MLPA, tümör belirteci

BENCHMARKING OF METHYLATION AND EXPRESSION STATUS OF RELEVANT TUMOR SUPPRESSOR GENES IN BREAST CANCER

ABSTRACT

Objective: In the era of personalized treatment modalities when the molecular classification of the cancer which is developed on genetic basis, investigating the genetic and epigenetic status of tumor samples of patients will lead the details about diagnosis, treatment and prognosis to be valued.

Method: We investigated the expression levels and the methylation status of promoters of 23 genes which are accepted as tumor suppressors in invasive breast cancer tissue and evaluated with the histopathologic prognostic findings and demographic informations belongs to the patient. qRT-PCR and mMLPA techniques were recruited for expression and epigenetic studies, respectively.

Results: We found 38% and 47% of the genes to be down and up regulated, respectively, in comparison to healthy normal tissues; the adjacent normal tissues showed a significant difference from healthy normal tissues, at least 17 of the genes are regulated in either way and 17,1 fold per gene in average. The 14% of the promoter regions belonging to same genes showed hypermethylation. The adjacent tissues showed a lower rate of methylation while healthy normals showed none. The most prominent changes in expression belonged to ESR1 and TP53 in means of decrease and increase, respectively. The most frequently methylated gene was RASSF1. The downregulation patterns of RASSF1, TIMP3, CDH13 and ESR1 showed similarities, when decrease in level of CDH13 level is related with higher levels of CD44 significantly. The decrease in expression of BRCA1 and increase in CD44 and BRCA2 is related with the distant metastasis; decrease in ESR1, CDH13 and increase in CD44 is related with resistance to hormonal therapy, increased mitotic activity and bad prognosis. ESR1 is found to be decreased while CD44 is increased in ER and HER2 negative tumors. ESR1 expression is also reduced in ductal type, but did not change significantly in mixed tumors. The decrease in expression levels of BRCA1 gene could be associated with the presence of methylation in the respective promotor area. No other such relations with other

genes could be addressed.

Conclusion: It is obvious that molecular analyses are informative about the character of breast cancer. Moleküler analizlerin meme kanserinin karakteri hakkında bilgi verici olduğu açıktır. But without doubt, performing studies in large patient groups where advanced statistical analysis of combination of clustering and multivariate regression calculations, called data mining, can be applied is extremely important. So, it has to be among primary goals to form and maintain tumor biobanks which can enable fast and reliable practicing of precious studies in large groups.

Keywords: breast cancer, q-RT-PCR, m-MLPA, tumor marker

I. GİRİŞ VE AMAC

Meme kanseri, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde kadınlar arasında en sık görülen kanser tipidir ve gelişmiş ülkelerde en sık, gelişmekte olan ülkelerde ise ikinci sıklıkla kanserden ölüm nedenidir. Kadınlar arasında ise en önde gelen kanser ölüm nedenidir [1,2]. Batılaşmış toplumlarda en azından son 25 yıldır meme kanser insidansı yaklaşık %30 artış gösterirken, ABD’de mamografi kullanımı ve hormon replasman tedavisine bağlanan nedenlerle 2001-2004 yılları arasında meme kanser insidansının azaldığı görülmüştür [2]. Diğer taraftan nedeni tam olarak anlaşılmamakla birlikte üreme, beslenme özelliklerinin değişmesi ve fiziksel aktivitenin azalmasına bağlanan nedenlerle Asya ve Afrika’da gelişen ülkelerde insidans oranı artmıştır [2]. Ancak meme kanser insidansının artmasına rağmen son 25 yıldır bazı ülkelerde mortalite oranı sabit kaldı ya da azalmıştır [1,3]. Gelişmiş ülkelerde mortalite oranının azalması, mammografi ile erken tanının konması ve geliştirilen tedavilere bağlanabilir [4]. Meme kanseri oluşumundan sorumlu olarak tanımlanan risk faktörlerinin çoğu (yaş, aile hikayesi, ilk hamilelik yaşı, erken menarş, geç menopoz, meme yoğunluğu, vb.) değiştirilebilir faktörler değildir [5].

Türkiye’de de 1990 yılından itibaren kanser en sık görülen 2. ölüm nedeni ve Türkiye’de ve İzmir’de kadınlarda en sık görülen kanser tipi meme kanseri olarak ortaya çıkmaktadır [6,7].

Tümör evrelendirme sistemi TNM, hastaların prognozunu göstermesi, tedavi planlarında yol gösterici olması ve uygulanan tedavi etkilerinin takibine yardımcı olması sebebiyle 1953 yılından beri ortak dil olmuştur [8]. Ancak meme kanserinin tedavi anlayışı, son 20 yıl içinde Östrojen Reseptörü (ER) ve İnsan epitel Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (HER2) sinyal yolağını hedefleyen tedavilerle birlikte değişti. Artık tedavi seçiminde, hastalığın doğal seyriyle ilişkili olup sistemik adjuvan tedavinin yokluğunda sağ kalım ile ilişkili olan prognostik faktörler ve tedaviye verilecek yanıt ile ilişkili ölçümler olan öngörüselsel faktörler değerlendirilmektedir. Ancak günümüzde kullanılan kesin prognostik ve prediktif faktörlerin kısıtlılığı nedeniyle hastaların bir bölümü tedaviden yararlanamamaktadır. Mevcut prognostik faktörlere göre sınıflandırıldığında, düşük riskli hastaların bir kısmı nüksedebilir ya da yüksek riskli gruba

dahil hastalarda nüks görülmeyebilir. Daha genç kadınlara uygulanan daha agresif tedaviler uzun dönemde sekellere yol açabilir. Diğer sağlık problemlerinin varlığı nedeniyle daha yaşlı kadınlar agresif tedavinin toksisitetlerine daha duyarlı olabilir. Tedavinin ana hedefi yalnızca hastalıksız sağ kalım değil, aynı zamanda toplam yaşam süresi ve yaşam kalitesi de olduğundan toksisiteden kaçınmak için adjuvan sistemik tedaviden yarar görebilecek hastaların seçiminde kullanılabilecek yeni faktörlerin keşfedilmesini amaçlayan çalışmalar yapılmaktadır.

Kanser dokusuna uygulanabilecek her moleküler analitik yöntem potansiyel olarak prognostik ve öngörüsül faktörleri tespit etme gücüne sahiptir. qRT-PCR ve *microarray* gibi moleküler tekniklerle gerçekleştirilen gen ekspresyon profilleri ile meme kanserinin heterojenitesini açıklama çabaları tümörün moleküler sınıflamasını gündeme soktu ve sporadik meme kanserleri arasında gen ekspresyon farklılıklarını belirleyen ilk kapsamlı ve çığır açan girişim 2000 yılında Perou ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilerek meme tümörleri 4 ana gruba ayrıldı [9]. Ancak meme kanserinin moleküler alt gruplarını küçük gruplarıyla birlikte tanımlayacak standardize yöntemlerin geliştirilmesi, prognostik ve öngörüsül göstergelerin çok daha büyük hasta gruplarını içeren klinik çalışmalarla birlikte denenmesi, moleküler tiplerin yeni alt gruplarının ortaya çıkmasına yol açması, bu grupların tedaviyi yönlendirmesi beklenen gelişmelerdir.

Ayrıca, nod negatif meme kanserinde adjuvan kemoterapi önerilen meme kanseri vakalarının bir bölümünün adjuvan tedavi almadan tedavi olması ve hastaların tedaviye verdikleri yanıtların farklılığı, hastaların nüks risklerine göre tanımlanmasını sağlayacak, tedaviye verilecek yanıtı öngörebilecek moleküler yaklaşımları gündeme getirdi. *Microarray* ve diğer yüksek işlem hacmine sahip deneylerde çoklu değişkenlerin test edilmesi, prognostik ve prediktif çalışmaların yürütülmesi için hem yönetsel hem de istatiksül değişikliklere sebep oldu. FDA (Food and Drug Administration), 2007 yılında yayınlanan taslak kılavuzla tek bir laboratuvar tarafından geliştirilen, tek bir laboratuvarda uygulanan ve klinik laboratuvar hizmetleri olarak sunulmaya başlayan yeni genetik testleri, *In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays: Vücut Dışı Çok Değişken Endeksli Tanı Testleri (IVDMVIA)* olarak isimlendirerek, bunları düzenleme otoritesine sahip olduğunu açıkladı; böylece yeni testlerin geliştirilmesi ve klinik kullanımının yolunu açmıştır [10].

Diğer taraftan, epigenetik değişiklikler sebebiyle nükleotit dizilerinde değişiklik yaratılmadan gen ekspresyonu değişebilmektedir. Memeli genomunda promotor bölgelerde yer alan CpG adalarındaki sitozin rezidülerinin metilasyonu, en iyi karakterize edilen epigenetik değişimdir. Son yıllarda bu değişimler, memeli hücrelerinde gen ekspresyonunun regülasyonunda en önemli mekanizma olarak tanımlanırken, tümör gelişimi ve progresyonunda da etkin olduğu kabul edilmektedir [11].

Bireysel tedavi modalitelerinin giderek ön plana çıktığı bu çağda, genetik temel üzerinde gelişen kanserin sınıflandırmasının moleküler düzeyde yapılmasının önemi kabul görünürken, hasta tümör örneklerinin genetik ve epigenetik durumlarının incelenmesi hastalık hakkında tanı, tedavi ve prognoz ile ilişkili detayların bilinmesine yol açacaktır.

Bu amaç doğrultusunda planlanan çalışma ile, tümör süpresör gen olarak kabul gören bazı genlerin invazif meme tümörü dokusundaki ekspresyon düzeyleri ile bu genlerin promotor bölgelerinin metilasyon durumları incelenmiş, gözlemlerin sonuçları ile meme tümörünün histopatolojik prognostik bulguları ve hataların bazı demografik bilgileri ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Meme tümörü dokusunda söz konusu genler ile ilgili promotor bölgelerde metilasyon durumunun olup olmadığı, sağlıklı normal meme dokusu ile karşılaştırıldığında ekspresyon düzeylerinin değişip değişmediği, bir değişiklik var ise bunun metilasyona bağlı olup olmadığı incelenmiş; tüm hastalar içerisinde demografik bilgiler veya histopatolojik prognostik skorlar ile açıklanabilecek herhangi bir alt grubun veya grupların diğerlerinden belirgin derecede farklı olup olmadığı analiz edilmiştir. Ayrıca çalışmada, meme kanseri hastalarında cerrahi tümör sınırı dışındaki histopatolojik olarak sağlıklı gözlemlenen alınan meme dokuları ile bir adet benign meme lezyonu da benzer şekilde incelenerek, normal ve tümör dokuların profilleriyle karşılaştırılmıştır.

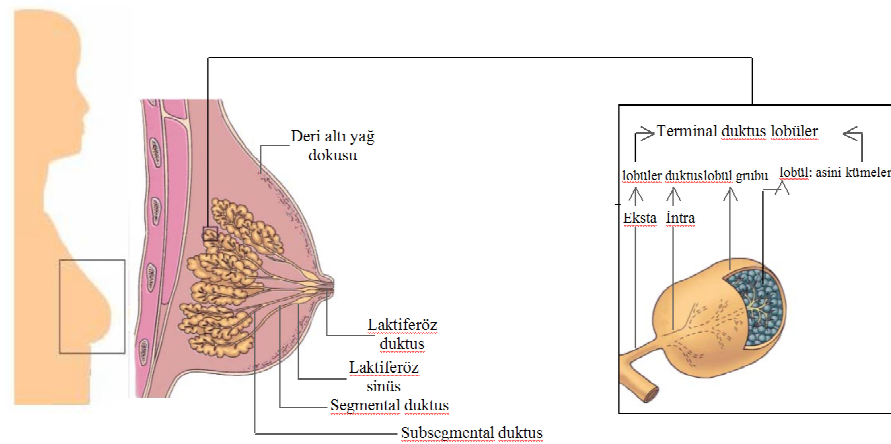
II. GENEL BİLGİLER

1. MEME

1.1. Memenin Anatomisi

Erişkin bir kadında meme bezi, ön göğüs duvarında pektoral fasyanın yüzeysel ve derin tabakaları arasında bulunur ve sternumun kenarından ön ve yan orta aksiller çizgiye kadar uzanır [12].

Gelişmiş meme, asinüs, duktus, ve stromal elamanlardan oluşur. Asinüsler memenin salgı yapan birimidir. İçleri küboid veya silindirik epitel ile döşelidir. Dışı ise bağ dokusu, kan ve lenf damarları ile sarıdır. Asinüsler bir araya gelerek lobülleri, lobüller de lobları oluşturur. Epitelyal parankim her biri ayrı bir salgı kanalı ile meme başına açılan 15-20 loptan meydana gelir [12-15]. Her lopta 20-40 kadar lobül içerir. Her duktus bir meme lobunu ve 20-40 kadar lobülü drene eder (Şekil 1). Her bir lobülde toplayıcı duktus çevresinde gruplaşmış sayıları 10 ile 100 arasında değişen asinüsler bulunur. Lobüller meme bezinin esas yapısal birimini oluşturur. Genç kadınlarda sayıca fazla ve daha büyük görünümündedirler. Menopozdan sonra ise lobüllerin sayısı azalır ve her biri yalnızca birkaç asinüs içeren küçük üniteler şekline dönüşür [13,14].



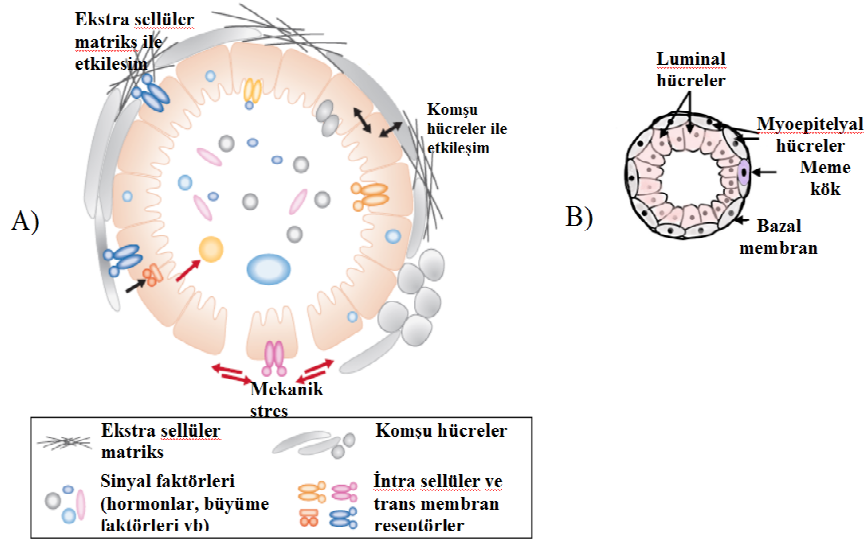
Şekil 1. Memenin anatomisi

1.2. Meme Dokusunun Biyolojik Özellikleri

Meme dokusu, embriyonal, ergenlik, gebelik, laktasyon, laktasyon sonrası ve menopo evreleri boyunca değişime uğrar. Yetişkinlerde meme epitel hücrelerinin büyüme, diferansiyasyon ve regresyonu dönemler halinde tekrarlanır. Hamilelik, laktasyon ve involüsyonun her siklusu hücresel proliferasyon, fonksiyonel diferansiyasyon ve hücre ölümüyle birlikte. Bu gelişimsel basamaklar stromal epitel hücre etkileşimleri ile, lokal olarak rol oynayan steroid ve peptid hormonlar ile ve de sistemik olarak düzenlenir [16].

1.3. Meme Dokusu Epitel Hücre Organizasyonu

Meme bezi, meme yağ yastığı ve stromal konnektif dokunun içine gömülü olarak bulunan, süt üreten alveolar epitel hücreleri ve duktal hücreleri içerir. Meme epitel hücreleri polarize morfolojiye, özelleşmiş hücre-hücre etkileşimine ve bazal membrana spesifik bağlantılara bağımlı olarak üç boyutlu yapı içinde organize olur. Komşu hücrelerden gelen mekanik güç ve sinyaller de hücresel organizasyonu etkiler (Şekil 2) [17]. Bu özellikler hücre proliferasyonu, sağ kalım, diferansiyasyon, migrasyon ve süt sekresyonunun uygun kontrolü için gereklidir [18-20]. Transformasyona uğrayan meme epitel hücresi organizasyon yeteneğini kaybeder [20].



Şekil 2. Meme epitelinin hücresel yapısı

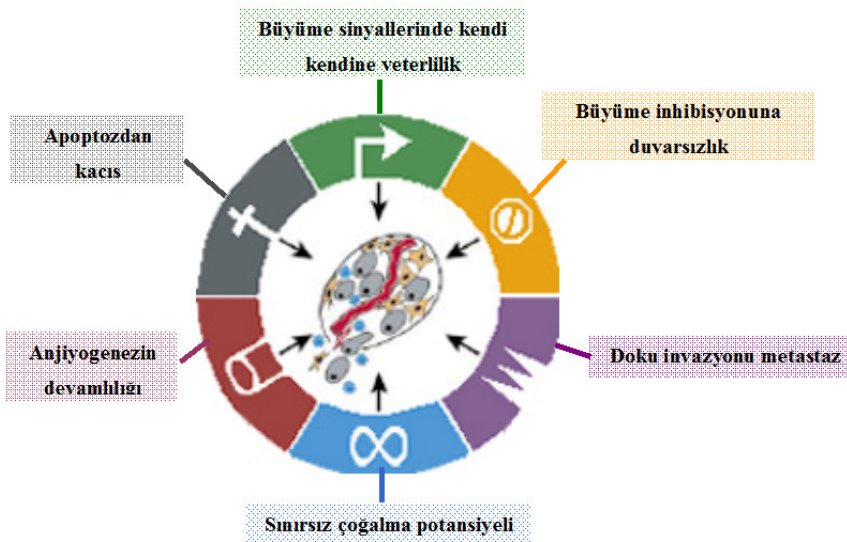
a) Hücre yapısını organize eden faktörler, b) Bir meme asinüsünün yapısı

2. MEME KANSERİ

2.1. Karsinogenez

Hem deneysel modellerde kanser fenotipinin oluşturulması, hem de insan kanser hücrelerindeki değişikliklerin gösterilmesi sırasında onkogenleri baskın hale getiren, tümör süpresör genleri sessizleştiren ya da fonksiyonunu önleyen mutasyonlar keşfedilmiştir [21]. Çok basamaklı süreç ile normal hücrelerin malign hücelere transformasyonunu yöneten hücresel olaylar, kanserlerin çoğunun, belki de hepsinin ortak paylaşımıdır. Darwin'in evrim teorisine uygun olarak, genetik ya da epigenetik olaylarla diğer hücelere göre büyüme avantajı kazanan hücelerin tümör oluşumuna yol açtığı düşünülmektedir [21].

Normal hücre proliferasyonu üzerindeki homeostaz, kanser gelişimine direnci oluşturur ve kanser hücelesine dönüşüm sürecinde bu engeller aşılmalıdır. Kanser hücre genotipini yansıttığı kabul edilen homeostatik değişiklikler: büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, büyüme engelleyen sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kurtuluş, sınırsız çoğalabilme gücü, devam eden anjiyogenez, doku invazyon ve metastaz yeteneği olarak özetlenebilir (Şekil 3) [17,21].



Şekil 3. Kanser hücelerinin kazanımları

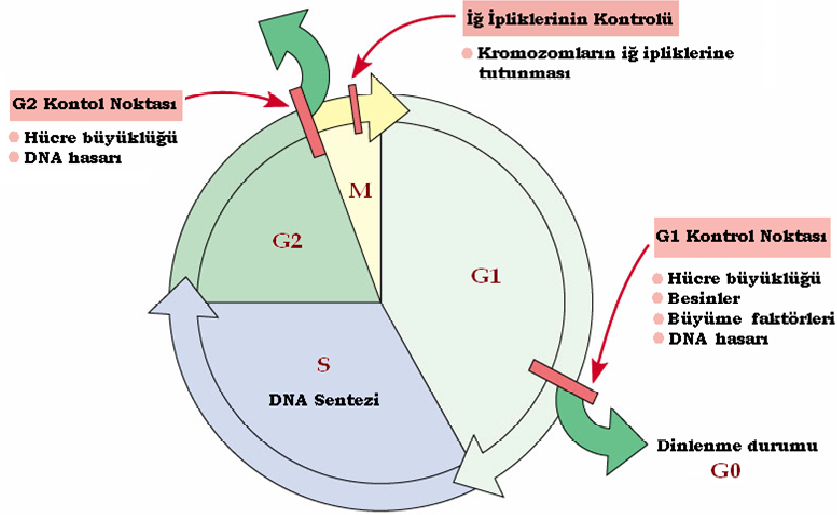
Büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik: Normal hücrelerin sessiz durumdan aktif proliferatif duruma geçişinden önce mitojenik sinyallere gereksinimi vardır. Bu sinyaller, genellikle sinyal moleküllerinin transmembran reseptörlere bağlanması ile hücre içine geçer. Normal hücrelerin çoğalma sürecinde büyüme sinyallerine bağımlılığı açıktır. Tümör hücrelerinin, büyüme sinyallerinin çoğunu kendi oluşturduğu, böylece normal doku mikroçevresinden gelecek uyarılara bağımlılığını azalttığı düşünülür. Hücre dışından gelen uyarılardan bağımsız davranış, doku içindeki hücre tiplerinin uygun davranışı için gerekli işleyişi sağlayan en önemli homeostatik mekanizma bozukluğudur. Kazanılan büyüme otonomisi baskın karakterde onkogenlerin aktivasyonu ile açıklanabilir. Büyüme faktörlerinin (GF) sinyallerini hücre içine taşıyan hücre yüzey reseptörleri tümör patogenezi sırasında önemli hedeflerdendir. Bu reseptörlerin çoğu sitoplazmik domainlerinde tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve bir çok kanser tipinde fazla ekspresyonları görülür. Reseptörün fazla ekspresyonu, fazla yanıt vermesine neden olabilir [22]. Örneğin epidermal GF (EGF) reseptörlerinden HER2, mide ve meme kanserlerinde çok fazla eksprese olur [23, 24]. Küntleşen EGF reseptörlerin yapısal değişiklikleri liganattan bağımsız sinyallerin oluşumuna neden olabilir [22]. Aktif büyüme sinyalini alan ve nukleusa taşıyan SOS-Ras-Raf-MAPK gibi sinyal yolaklarındaki küçük sinyal moleküllerinin mutasyonu da kanser hücrelerinin otonomik büyümesini sağlayan sık bir mekanizmadır [25,26].

Büyüme engelleyen sinyallere duyarsızlık: Normal dokuda proliferasyonu önleyen sinyaller, iki farklı mekanizma ile çalışır: Hücreler aktif proliferatif sıklüstan sessiz forma (Go) girebilir (Şekil 4) veya hücreler kalıcı olarak proliferatif özelliklerinden vazgeçebilir, genellikle spesifik diferansiyasyon ile birlikte olan özellikleri kazanarak post mitotik forma dönüşebilir [21].

Hücre hücre siklusunun G1 fazında, sessiz forma dönüşeceğine, post mitotik forma girip diferansiye olacağına ya da sıklüsta ilerleyip çoğalacağına karar verir. Moleküler düzeyde hücre siklusunun G1'den S fazına girerek ilerlemesi aşamasında normal hücre siklusunun kaybı, malign transformasyonda merkezi bir rol oynar (Şekil 4) [27]. Hücrelerin postmitotik, diferansiyasyonu tamamlanmış hücre formuna geçişi henüz tam olarak anlaşılmasa da tümör hücreleri, bu terminal diferansiyasyondan çeşitli yöntemleri kullanarak kurtulur [22].

Apoptozdan kurtuluş: Apoptoz, çok hücreli canlılarda doku bütünlüğünün ve

fonksiyonunun devamına izin verir, hasarlı ya da istenmeyen hücreleri eler. Malign hücre birikimi, apoptozu düzenleyen genlerin de mutasyonlarına gereksinim duyar [28].



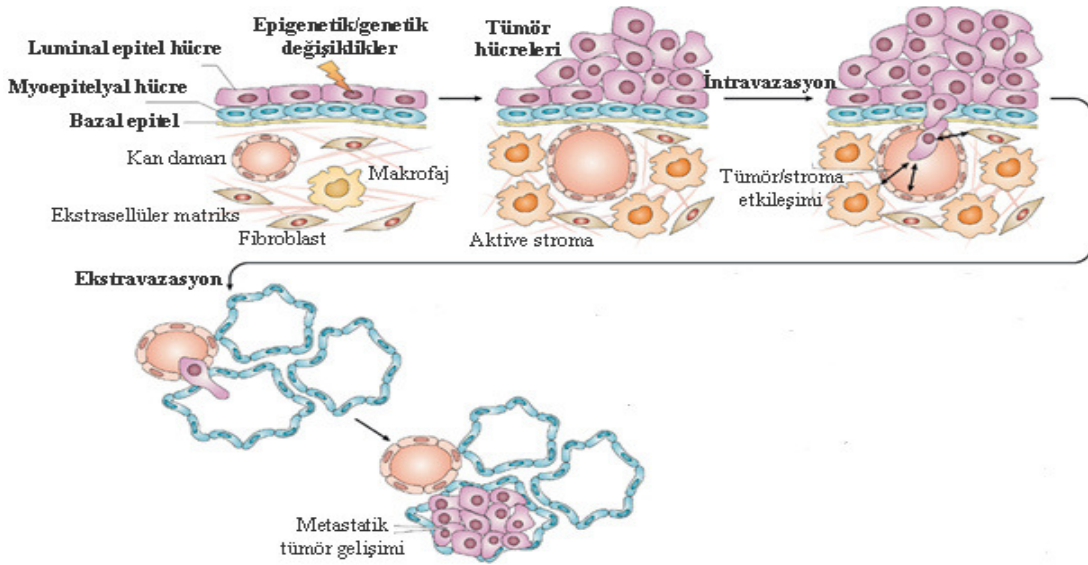
Şekil 4. Hücre siklüsü

Sınırsız çoğalabilme gücü: Normal hücrelerin çoğu kendi replikasyonlarını sınırlamak üzere programlanmıştır. Tümör hücrelerinin sınırsız çoğalma yeteneğini kazanabilmesi için immortal özelliğini kazanması gereklidir [29].

Anjiyogenezin sürekliliği: Normal doku fonksiyonlarının devamı oksijen ve besinlere ulaşılabilirliğine ve metabolik atıklarının temizlenmesine bağlıdır. Yeni kan damarlarının oluşma süreci olan anjiyogenez, anjiyogenezi uyarıcı ve inhibe eden faktörlerin dengesi ile düzenlenir [29]. Tümör hücrelerinde yaşamın devamlılığı bu dengenin uyarı yönüne kaymasını gerektirir.

Doku invazyon ve metastaz yeteneği: İnvazyon ve metastazın gerçekleşmesi diğer özelliklerin kazanımına ve ek hüresel değişikliklere bağlıdır. İnvazyon ve metastaz süreci son derece kompleksdir. Genetik ve kimyasal belirleyicileri tam olarak anlaşılmasa da birbiriyle çok yakın iki süreçtir. Tümör hücrelerinin birbirinden ayrılması, matris proteinlerine tutunması, ekstrasellüler matrisin parçalanması, dolaşıma geçmesi, dolaşımda bağışıklık sisteminden kaçması ve yeni yerleşim yerinde bu basamakların tekrarı gereklidir (Şekil 5) [22,30].

Kanserin fenotipik değişikliklerini oluşturan genetik yapısal değişiklikler genin ekspresyonundan başlayıp fonksiyonel protein oluşumuna kadar tüm süreci kapsar. Pek çok sayıda genetik ve epigenetik değişikler kanser hücresinde birikir. Monoklonal olarak başlayan tümör, klinik olarak belirgin hale geldiğinde, bu biriken değişiklikler nedeniyle oluşan ve yaşayabilen alt klonların varlığı ile son derece heterojendir [31]. Tümör hücresinin genetik profilinin tümörün davranışını belirlediğine inanılır.



şekil 5. Meme kanserinin ilerleyişi

2.2. Meme Kanseri Gelişimi

Meme kanserinin temel biyolojisi üzerindeki çalışmalar, meme kanseri yatkınlığında, başlangıcında ve gelişiminde rolü bulunan genlerin ve hücrelerin tanımlamasında önemli gelişmelere yol açmıştır. Meme tümörleri, farklı hücre gruplarından meydana gelen heterojen yapıya sahiptir. Bu heterojen yapıyı açıklamak üzere iki hipotez vardır:

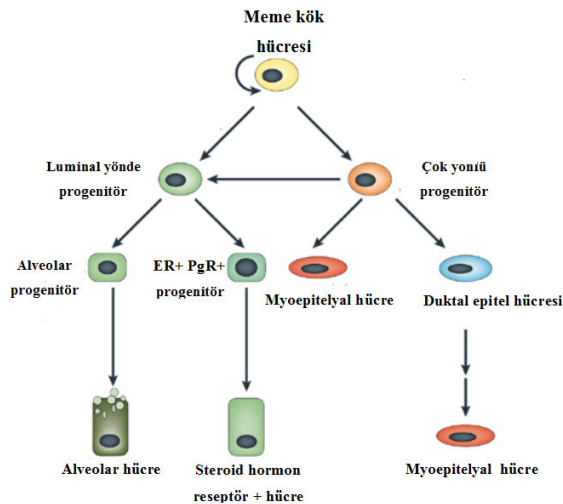
- 1- Meme bezinde var olan hücrelerin her biri genetik değişikliklerin birikimi ile tümörjenik olma kapasitesine sahiptir.
- 2- Yalnızca meme bezinde ender bulunan özel hücrelerden tümör gelişebilir [32]. Meme

kanserinin bu hipotezler doğrultusunda mı yoksa her ikisinin birlikteliğinden mi meydana geldiği halen araştırılmaktadır.

Yetişkin dokulardaki kök hücreler, belirli bir doku ya da organın normal fonksiyonu için gerekli olan hücre yapısına diferansiye olabilen, kendi kendini yenilemek için bölünme yeteneğindeki hücrelerdir. Son yıllarda kanser kök hücre hipotezi ile tümörlerin, kendi kendilerini yenileme süreçleri bozulan normal kök hücre ya da progenitör hücrede ortaya çıktığı kök hücre özellikleri kalan hücresel bileşenler ile yönetildiği ileri sürüldü [33]. Hematopoetik sistem ve kanserleri üzerindeki çalışmalar kök hücre ve farklı özellikleri olan progenitör hücre gruplarının onkogenезin hedefi olduğu gösterildi [34].

Meme bezi epitel kök hücresi de önemli derecede hem diferansiyasyon, hem de kendi kendini yeniden üretme yeteneğine sahip olan meme bezi epitel kök hücrelerinden deneysel koşullarda fonksiyonel meme bezi oluşturuldu [35]. Puberte, hamilelik, laktasyon ve involüsyon sırasında değişim gösteren meme bezinin normal büyüme ve diferansiyasyonu için gerekli olduğu önerildi (Şekil 6) [36].

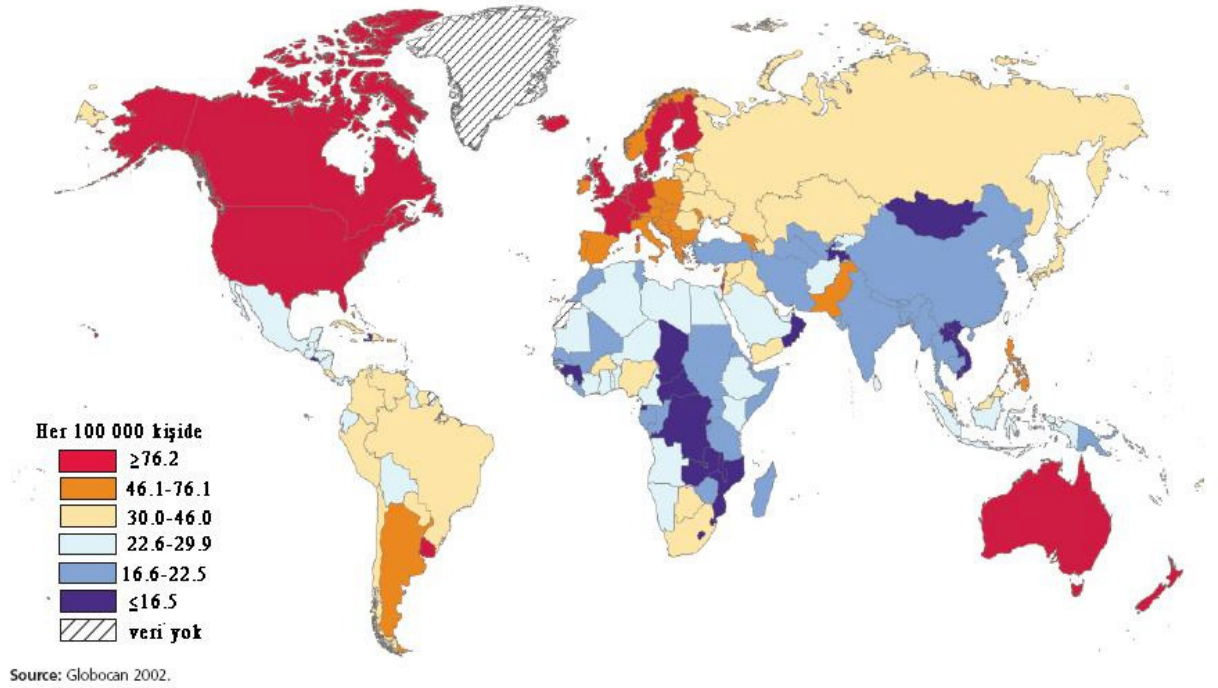
Meme kanser kök hücre yaklaşımı henüz yeni olmasına rağmen araştırmacılar farelerde oluşan insan meme tümör kitlesinde meme kanser başlatıcı hücrelerini tanımladı [37]. Bu transforme kök hücreler heterojen meme tümörlerini geliştirme yeteneğindedir ve bilinen tümör hücre popülasyonunu göstermesinin mümkün olduğu önerildi. Bu bulgular tedavi alanlarında önemlidir. Bu hipotez için halen daha fazla doğrulamaya gereksinim vardır.



Şekil 6. Meme kök hücresi ve olası progenitör hücreler

2.3. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi

Amerika Kanser Topluluğu'nun (ACS) 2007 yılı için yaptığı tahminlere göre; gelişmiş ülkelerde 5.4 milyon, gelişmekte olan ülkelerde 6,7 milyon olmak üzere dünyada 12 milyondan fazla kişinin yeni kanser tanısı alması, gelişmiş ülkelerde 2,9 milyon, gelişmekte olan ülkelerde ise 4,7 milyon olmak üzere toplam 7,6 milyon (günde yaklaşık 200.000) kişinin ise kanser nedeni öleceği beklenmektedir. Nüfusun artması ve yaşlanması nedeniyle 2050 yılında 27 milyon yeni kanser vakası 17,5 milyon kanser nedeni ölüm tahmin edilmektedir (Tablo 1) [1]. Bu verilere göre meme kanseri hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde kadınlar arasında en sık görülen kanser tipidir (Şekil 7) [1]. Uluslararası insidans oranı 25 kattan daha fazla değişir. Kuzey Amerika, Avustralya, Kuzey ve batı Avrupa'da insidans en yüksek, Doğu Avrupa'da orta derecede yüksekken Afrika ve Asya'nın büyük ölümünde insidans oranları düşüktür (Şekil 6).



Şekil 7. Dünyada meme kanseri insidansı oranları

Tablo 1. Dünyada yeni tanı alan kanser vakaları ve ölüm oranları, 2007

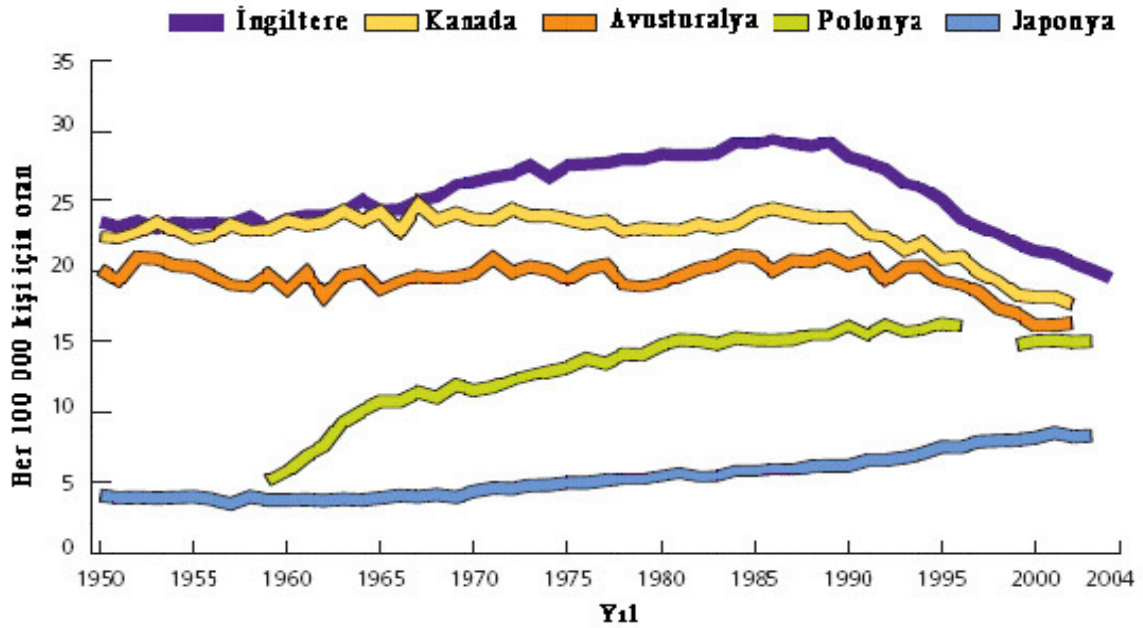
Cinsiyet	Dünya		Gelişmiş ülkeler		Gelişmekte olan ülkeler	
	Yeni vaka	Ölüm	Yeni vaka	Ölüm	Yeni vaka	Ölüm
Erkek	Akciğer	Akciğer	Prostat	Akciğer	Akciğer	Akciğer
	1.108.731	974.624	566.841	465.540	564.306	496.287
	Prostat	Mide	Akciğer	Kolon/rektum	Mide	Karaciğer
	782.647	511.549	529.176	175.774	474.580	399.317
	Mide	Karaciğer	Kolon/rektum	Prostat	Karaciğer	Mide
	691.432	474.215	387.637	143.834	424.490	370.158
	Kolon/rektum	Özofagus	Mide	Mide	Özofagus	Özofagus
	630.358	300.034	214.534	141.218	300.763	246.667
	Karaciğer	Prostat	Mesane	Karaciğer	Kolon/rektum	Kolon/rektum
	502.571	253.906	191.812	78.174	228.108	137.500
	Özofagus	Lösemi	Böbrek	Pankreas	Prostat	Prostat
	361.931	138.333	94.284	78.009	194.914	106.537
	Mesane	Pankreas	Non-Hodgin	Mesane	Oral kavite	Lösemi
	314.256	137.206	89.816	57.438	129.356	87.305
	Oral kavite	Mesane	Karaciğer	Özofagus	Mesane	Oral kavite
	200.774	124.266	81.448	55.186	115.817	68.124
	Non-Hodgin	Non-Hodgin	Pankreas	Lösemi	Lösemi	Non-Hodgin
	196.298	111.126	77.394	49.891	111.163	67.280
		Lösemi	Böbrek	Non-Hodgin	Mesane	
		74.955	44.019	103.433	65.702	
Kadın	Meme	Meme	Meme	Meme	Meme	Serviks
	1.301.867	464.854	679.682	203.528	529.233	272.238
	Serviks	Akciğer	Kolon/rektum	Akciğer	Serviks	Meme
	555.094	376.410	335.756	173.842	473.430	255.576
	Kolon/rektum	Serviks	Akciğer	Kolon/rektum	Mide	Mide
	536.662	309.808	209.707	165.480	250.650	199.391
	Akciğer	Mide	Korpus uteri	Mide	Akciğer	Akciğer
	440.390	288.681	146.866	89.620	224.580	198.066
	Mide	Kolon/rektum	Mide	Pankreas	Kolon/rektum	Karaciğer
	375.111	284.169	123.773	72.681	186.532	166.685
	Over	Karaciğer	Over	Over	Karaciğer	Özofagus
	230.555	205.656	103.332	66.925	171.794	129.080
	Corpus uteri	Özofagus	Serviks	Serviks	Özofagus	Kolon/rektum
	226.787	142.228	87.466	42.101	153.396	112.471
	Karaciğer	Over	Non-Hodgin	Karaciğer	Over	Over
	208.557	141.452	72.368	40.943	123.761	72.433
	Özofagus	Pankreas	Deri melanom	Lösemi	Oral kavite	Lösemi
	167.352	122.185	69.624	40.783	84.111	65.629
Lösemi	Lösemi	Pankreas	Non-Hodgin	Lösemi	Pankreas	
142.569	107.538	69.418	36.940	82.840	46.750	

Meme kanseri gelişmiş ülkelerde en sık, gelişmekte olan ülkelerde ise ikinci sıklıkla kanserden ölüm nedenidir. Kadınlar arasında ise en önde gelen kanser ölüm nedenidir [1,2].

Batılaşmış toplumlarda en azından son 25 yıldır meme kanser insidansı yaklaşık %30 artış gösterirken, ABD’de mamografi kullanımı ve hormon replasman tedavisine bağlanan nedenlerle 2001-2004 yılları arasında meme kanser insidansının azaldığı görüldü [2]. Nedeni tam olarak anlaşılacakla birlikte üreme, beslenme özelliklerinin değişmesi ve fiziksel aktivitenin azalmasına bağlanan nedenlerle Asya ve Afrika’da gelişen ülkelerde insidans oranı arttı [2].

Meme kanser insidansının artmasına rağmen son 25 yıldır bazı ülkelerde mortalite oranı sabit kaldı ya da azaldı (Şekil 8) [1,3]. Gelişmiş ülkelerde mortalite oranının azalması, mamografi ile erken tanının konması ve geliştirilen tedavilere bağlanabilir [4].

Meme kanseri, Türkiye’de 1990 yılından itibaren kanser en sık görülen 2. ölüm nedeni ve Türkiye’de ve İzmir’de kadınlarda en sık görülen kanser tipidir [6, 7].



Şekil 8. Ülkeler arasında meme kanser ölüm oranları
Kırık çizgiler kaydına ulaşılamayan verileri göstermektedir.

2.4. Meme Kanserinde Risk Faktörleri

Meme kanseri oluşumundan sorumlu bir çok risk faktörü tanımlanmıştır. Bilinen meme kanser risk faktörlerinin çoğu (yaş, aile hikayesi, ilk hamilelik yaşı, erken menarş, geç menopoz, meme yoğunluğu, vb.) değiştirilebilir faktörler değildir. Bununla birlikte post menopozal obezite, post menopozal homonların kullanımı, alkol alımı, fiziksel inaktivite gibi faktörler değiştirilebilir. Bazı risk faktörleri (erken menarş, geç menopoz, obezite, hormon kullanımı) meme dokusunun dolaşımdaki over hormonlarının etkisini direk olarak arttırır. Yüksek sosyoekonomik durum gibi risk faktörleri ise üreme davranışı ile ilişkilidir. Bu risk faktörleri ve birlikteliklerinin etki gücüyle Tablo 2' de özetlendi [5].

Yaş: Yaş meme kanserinde en önemli risk faktörüdür. Meme kanser insidansı ve ölüm oranları genellikle yaş ile birlikte artar. 2000-2004 yılları arasında yeni vakaların %95'i ve meme kanser ölümlerinin %97'si 40 yaş ve daha üzeridir. 2000-2004 yılları arasında 20-24 yaşındaki kadınlar arasında en düşük meme kanser insidansı (her 100.000 kadında 1,4 vaka) görülürken, 75-79 yaş arası (her 100.000 kadında 464,8 vaka) kadınlar en yüksek insidansa sahiptir [5]. 2000-2004 yılları arasında meme kanser tanısı alan kişilerin ortalama yaşı 61'dir [5].

Aile hikayesi/genetik yatkınlık: özellikle birinci dereceden akrabasında (anne, kız kardeş gibi) meme kanseri hikayesi olan kişiler meme kanseri için daha fazla risk taşırlar [38]. Risk, birden fazla birinci dereceden akrabasında meme kanseri varsa ve erken yaşlarda tanı konmuşsa risk daha yüksektir. Meme kanserlerinin %5-10'u BRCA1 ve BRCA2 genlerinde kalıtılan mutasyonlar ve değişikliklerden oluştuğu tahmin edilmektedir [39]. Bu mutasyonlar genel toplumun %1'inden daha azında bulunur [40]. Toplum bazlı çalışmalarda BRCA1 mutasyonu taşıyan 70 yaşındaki kadınlarda meme kanseri görülme riski %65'tir [41]. Kalıtsal meme kanserinden sorumlu bazı BRCA mutasyonlarını tanımlayan moleküler klinik testlere ticari olarak ulaşılabilir, ancak henüz bu testlerin yorumu ve tedavi kararı karmaşıktır ve zordur [38]. Bu mutasyonları taşıyan kişilerde meme kanseri gelişip gelişmeyeceğini tahmin etmek mümkün değildir. Ayrıca meme kanser riskini etkileyen genlerin tümüne ticari olarak henüz ulaşılmamaktadır. Meme kanser aile hikayesinin hastalık riskinde kalıtsal etkilerinin olduğu önerilmekle birlikte ailesel risk yalnızca BRCA1 ve BRCA2 genleri ile ilişkili

değildir. Yaşam tarzı ve bu genetik yatkınlık arasındaki etkileşim ile meydana geldiğine inanılmaktadır [43].

Tablo 2. Kadınlarda göğüs kanseri risk faktörleri

Nispi Risk*	Faktör
> 4.0	Cinsiyet Yaş Meme kanseri için kalıtılan genetik mutasyonlar (BRCA1, BRCA2 gibi) Erken yaşlarda birinci dereceden ≤ 2 akrabasında meme kanseri tanısı Kişinin meme kanseri hikayesi Yoğun meme dokusu Biyopsi ile doğrulanan atipik hiperplazi
2.1 - 4	Meme kanseri tanısı alan akraba Göğüs duvarına yüksek doz radyasyon Yüksek kemik dansitesi (post menopozal)
1.1 – 2.0	İlk tamamlanan gebeliğin ileri yaşlarda olması (> 30yaş) Erken menarş (<12 yaş) Geç menopoz (>55 yaş) Hamileliklerin tamamlanmaması Emzirmeme Son zamanlarda oral kontraseptif kullanımı Hormon replasman tedavisinin son zamanlarda ve uzun kullanımı Obezite (postmenopozal) Kişinin endometrium, kolon, over kanseri hikayesi Uzun boy Yüksek sosyoekonomik seviye Yahudi ırkı

*: Nispi risk, faktörlerinin birliktelik halindeki risklerini göstermektedir.

Hormonal faktörler: Üreme hormonlarının kanserin büyümesini başlattığı kadar hücre proliferasyonu ve DNA hasarındaki etkileri nedeniyle meme kanserini etkilediği düşünülmektedir. Erken menarş, (<12 yaş), geç menopoz (>55 yaş), ilk doğum yaşının ileri yaşlarda olması (>30 yaş) ve hamileliğin az sayıda olması kadınlarda meme kanser riskini

sentezlenen üreme hormonlarını etkileyerek arttırabilir [44,45]. Emzirmenin meme kanser riskini azalttığı gösterilmiştir [45,46]. Son zamanlarda oral kontraseptif kullanımı hafifçe yükseltebilir fakat en az 10 yıl oral kontraseptif kullanmayan kadınlar hiç oral kontraseptif kullanmamışlarla aynı riske sahiptir [47]. Kombine hormon replasman tedavisinin son zamanlarda uzun süre kullanımının meme kanser riskini arttırdığı gösterilmiştir [48,49]. Östrojenin tek başına meme kanser riskini arttırdığı görülmemiştir [50,51].

Klinik faktörler: Yoğun meme dokusunun (glandüler dokunun yağ dokusuna rölatif oranı) meme kanser gelişiminde güçlü bağımsız risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalarda meme kanser riskini 4 - 6 kat arttırdığı bulunmuştur [52-54]. Atipinin olmadığı proliferatif lezyonların meme kanseri riskini 1,5-2 kat arttırdığı, atipik olan proliferatif lezyonların ise 4-5 kat arttırdığı açıklanmıştır.

Obezite: Obezite, postmenopozal meme kanser riskini artırır. 18 yaşından sonra 20 kilo ve daha fazlasını alan kişilerde almayanlara göre meme kanseri riski 1.5 kat daha fazladır. Menopozdan sonra en azından 8 kilo kaybeden ve ağırlık kaybını devam ettirenler %57 oranında düşük meme kanser riskine sahipken, menopozdan sonra 8-10 kilo alan kişilerde %18 meme kanser riski daha fazladır [55]. Böylece daha fazla yağ dokusuna sahip olma östrojen seviyesini ve meme kanser gelişme riskinin olasılığını arttırdığı düşünülmektedir.

Fiziksel aktivite: Gittikçe artan veriler fiziksel aktivitenin meme kanser riskinde koruyucu etkisi olduğunu desteklemektedir [56,57]. Bir çok çalışma haftada 5 ya da daha fazla gün 45-60 dakika ya da düzenli biçimde etkin olarak yapılan egzersizler post menopozal meme kanser riskinin azalacağını savunmaktadır [57,58]. Genelde fiziksel aktivitenin koruyucu etkisi premenopozal, çocuk sahibi ve zayıf kadınlarda daha fazla olabilir. Bu koruyucu etkinin altında yatan mekanizma çok iyi anlaşılmamakla birlikte fiziksel aktivitenin hormon ve enerji dengesi üzerindeki düzenleyici etkisi nedeniyle önerilmiştir [59,60].

Alkol kullanımı: Alkol kullanımı sabit olarak artmış meme kanser riski ile birlikte [61-64]. 40 epidemiyolojik çalışmadan daha fazla çalışmanın meta analizi günde 24g alkol (2 double) tüketimi %21 artmış meme kanseri riski ile birlikte olabileceğini önermektedir. Bu artmış risk doz bağımlıdır ve süreklilikle ilişkilidir. Alkol tüketiminin artmış östrojen ve androjen düzeyleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [65].

Sigara: Çoğu çalışma aktif sigara içiciliği ve meme kanseri arasında direk ilişki bulamamıştır [62, 66].

Hormon replasman tedavisi (HRT): Kombine hormon replasman tedavisinin artmış meme kanseri ile birlikteliği bir çok çalışma tarafından gösterilmiştir [67,68]. HRT, meme dokusu yoğunluğunu arttırıp mamografi etkinliğini azaltması ile daha geç evrelerde tanı konan meme kanser riskini arttırabilir [69].

2.5. Meme Kanserinin Histolojik Tipleri

Meme kanserinin en sık kullanılan histopatolojik sınıflandırma sistemi Dünya Sağlık Örgütü (*World Health Organization: WHO*) sınıflandırmasıdır (Tablo 3) [70]. Dünyada vakaların %80'ini duktal, %10'nunu lobüler karsinom oluşturur. Diğer histolojik subtipler daha az oranda görülürler. İnvazif olmayalar ise ayrı grupta sınıflandırılır [70,71].

İnvazif duktal karsinom (spesifik olmayan tip): İnvazif meme karsinomlarının en sık görülen tipidir (%70-80) ve diğer alt tiplerden herhangi birine ait spesifik özellikleri taşımayan geniş bir grubu oluşturur.

Yaygın in situ komponent içeren invazif duktal karsinom: İnvazif karsinomlardaki in situ duktal karsinom komponenti oldukça değişkendir ve olguların çoğunda in situ ve invazif komponentin *gradeleri* birbiri ile paralellik gösterir. Eğer tümör içinde veya çevresinde invazif tümörün %25'inden fazlasını oluşturan in situ duktal karsinom var ise “yaygın in situ komponent içeren invazif duktal karsinom” olarak isimlendirilir. Bu durum özellikle meme koruyucu cerrahi uygulanmış olgularda lokal nüksler açısından önem taşır.

İnvazif lobüler karsinom: Tüm invazif meme karsinomlarının %5-15'ini oluşturur ve hormon replasman tedavisi alan kadınlarda daha sık görülür. Diğer tip invazif meme karsinomlarına göre daha yüksek oranda bilateral ve multifokal olurlar.

Tubuler karsinom: Meme karsinomlarının %2'sini oluşturmaktadır. Tubuler karsinomda prognoz çok iyidir ve multifokal olgular dışında aksiller metastaz genellikle %10'dan azdır.

İnvazif kribriiform karsinom: İnvazif karsinomların ender görülen bir tipi olup tubüler karsinom gibi çok iyi prognoza sahiptir.

Müsinöz (kolloidal) karsinom: Az görülen bir tip olup meme karsinomlarının %1-6'sını oluşturur. Daha çok ileri yaşlarda görülür ve prognozu iyidir.

Medüller karsinom: Meme karsinomlarının %1-5'ini oluşturur. Medüller karsinom daha çok 50 yaş altındaki kadınlarda ve BRCA1 genini taşıyanlarda daha sık görülür.

İnvazif papiller karsinom: İnvazif meme karsinomlarının nadir görülen bir tipidir. Prognozu genellikle iyidir.

İnvazif mikropapiller karsinom: İnvazif meme karsinomlarının %1-2'sini oluşturur. Genellikle miks tipte invazif karsinomlarda, özellikle invazif duktal karsinoma eşlik eden ikinci bir komponent şeklindedir. Bu tümörlerde lenfatik invazyon, lenf nodu metastazı ve multifokalite sık olduğundan prognozları kötüdür.

Sekretuar (jüvenil) karsinom: Nadirdir ve genellikle 30 yaş altındaki kadınlarda görülür ve prognozu oldukça iyidir.

Metaplastik karsinom: Nadir bir tümör olup, prognozu kötüdür.

Nöroendokrin karsinom: Meme karsinomlarının %2-5'ini oluşturur. Genellikle ileri yaş kadınlarda görülür. Bu grup tümörler gastrointestinal sistem ve akciğerdeki nöroendokrin tümörlere benzer morfolojik özellikler gösterirler. Tümör hücrelerinin %50'sinden fazlası nöroendokrin belirleyicileri eksprese etmektedir.

Apokrin karsinom: Nadir görülen tümör grubudur. Prognozu aynı grade ve evredeki invazif duktal karsinomlar ile aynıdır.

İnflamatuvar karsinom: İnvazif meme karsinomlarının özel bir klinik formudur. Dermal lenfatik invazyon sonucunda lenfatik drenaj bozulur ve deride ödem yanısıra eritem, endurasyon, hassasiyet ve portakal kabuğu görünümü vardır. İnflamatuvar bir durumu taklit etmesi nedeniyle bu adı alır. Mikroskopik olarak herhangi bir inflamatuvar tablo yoktur. Altta yatan invazif karsinom genellikle yüksek *gradeli* invazif duktal karsinomdur [70,71].

2.6. Meme Kanserinde Prognostik ve Prediktif Faktörler

Prognostik faktörler hastalığın doğal seyriyle ilişkili olup sistemik adjuvan tedavinin yokluğunda sağ kalım ile ilişkili, öngörüselsel faktörler ise tedaviye verilecek yanıt ile ilişkili ölçümlerdir. Hormon reseptör durumu ve HER2 ekspresyonu gibi durumlar hem prognostik hem de öngörüselsel olabilir [72]. Östrojen ve projesteron reseptörlerinin (sırasıyla ER ve PgR) yokluğu agresif patolojik özellikler kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [73]. Benzer şekilde, erken yaşta ortaya çıkan tümörler, geç yaşta olanlara daha agresiftir ve daha kötü prognoz gösterirler [74,75].

Meme kanseri tedavi karar sürecinde kullanılan prognostik ve prediktif faktörler, Tablo 4'te özetlendi.

Tablo 3. Meme kanseri histolojik tipleri: WHO sınıflaması

İn situ Karsinom

İn situ duktal karsinom
İn situ lobüler karsinom

İnvazif Karsinom

İnvazif duktal karsinom
İnvazif duktal karsinom
Tübüler karsinom
İnvazif kribriform karsinom
Medüller karsinom
Müsinöz karsinom
İnvazif papiller karsinom
İnvazif mikropapiller karsinom
Apokrin karsinom
Sekretuar (juvenil) karsinom
Adenoid kistik karsinom
Metaplastik karsinom
Nöroendokrin karsinom
İnflamatuvar karsinom

Tablo 4. Meme kanseri prognostik ve prediktif faktörler

Prognostik faktörler	Prognostik ve prediktif faktörler
Lenf düğümü durumu	ER ve PgR durumu
Tümör büyüklüğü	HER2 amplifikasyonu
Histolojik grade ve tip	İnvazyon faktörleri*
Lenfatik ve vasküler invazyon	Gen ekspresyon profili
Tanı yaşı	Dolaşımdaki tümör hücreleri
Etnik yapı	P53 mutasyonu
Proliferasyon belirteçleri*	Dolaşımdaki anjiyogenik faktörler
Katepsin D*	Topoizomeraz II durumu
Anjiyogenez belirteçleri*	BRCA gen mutasyonu
Kemik iliği mikrometastazı*	

*:araştırma düzeyinde

Son 20 yıldır meme kanseri tedavi anlayışı ER ve HER2 sinyal yolağını hedefleyen tedavilerle birlikte değişti. Bununla birlikte kesin ve kullanılabilir prognostik ve prediktif faktörlerin kısıtlılığı nedeniyle hastaların bir bölümü tedaviden yararlanamayabilir. Günümüzde kullanılan prognostik faktörlerle düşük riskli hastaların bir kısmı nüksedebilir ya da yüksek riskli gruba dahil hastalarda nüks görülmeyebilir. Daha genç kadınlara uygulanan daha agresif tedaviler uzun dönemde sekellere yol açabilir. Diğer sağlık problemlerinin varlığı nedeniyle daha yaşlı kadınlar agresif tedavinin toksisitelerine daha duyarlı olabilir. Tedavinin ana hedefi yalnızca hastalıksız sağ kalım değil, aynı zamanda toplam yaşam süresi ve yaşam kalitesi de olduğundan toksisiteden kaçınmak için adjuvan sistemik tedaviden yarar görebilecek hastaların seçiminde kullanılacak yeni faktörlerin keşfedilmesini amaçlayan çalışmalar yapılmaktadır.

3. EVRELEME

3.1. Kanserde Evreleme

Tümör evreleme sistemleri kanserin yayılımı ve ciddiyeti hakkında belli standartlara göre bilgi edinilmesini sağlar. TNM Evreleme Sistemi'nde tümörleri sınırlamak için kullanılan kriterler; tümör boyutu (T), aksiller lenf nodlarına yayılım (N) ve uzak bölgelere yayılımdır (M). Daha önceden tanımlanmış kriterlere göre bu üç özellik belirlenip kombine edilerek, TNM evresi hesaplanır (Tablo 5). Cerrahi sonrası görüntüleme yöntemleri uzak metastaz varlığını gösteriyorsa (inceleme tanıdan sonraki 4 ay içinde ve hastalık progresyonu yokken yapıldığında ve hasta henüz neoadjuvan tedavi almadıysa) evre değişebilir. Sistemin özetle 5 amacı vardır [73]:

1. Hastaların prognozunu göstermesi,
2. Tedavi planlarında yol gösterici olması,
3. Uygulanan tedavi etkilerinin takibine yardımcı olması,
4. Tedavi merkezleri arasında bilgi paylaşımını kolaylaştıran ortak dilin geliştirilmesi,
5. Tümör araştırmalarına katkıda bulunması.

Tüm kanser bölgelerine uyarlanabilecek evreleme sisteminin prensipleri ve kodları 1953 yılında cerrah Pierre Denoix tarafından geliştirildi, benimsendi ve 1968 yılında da yayınlandı [8,76]. American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından günümüze kadar 7 kez tanı ve tedavideki ilerlemelerin neden olduğu çeşitli düzenlemeler yapıldı [77-84]. 2013 Ocak ayında başlayacak olan çalışma ile ise 2015 yılı itibarı ile kanser tanısı alacak hastalarda kullanılmak üzere, 8. basısı planlanmaktadır [85].

3.2. Meme Kanseri TNM Evrelemesi

AJCC Kılavuzunda yer alan tanımlamalar şu şekildedir:

Klinik olarak belirgin: Lenfosintigrafi hariç görüntüleme yöntemleri, veya klinik muayene ile, veya patolojik olarak açıkça görülerek tümörün saptanması durumu,

Klinik olarak belirgin olmayan: Lenfosintigrafi hariç görüntüleme yöntemleri veya klinik muayene ile saptanamaması durumu,

İzole tümör hücreleri (İTH): Hemotoksilen eozin boyası ile doğrulanabilen ancak sıklıkla sadece immünohistokimyasal (İHK) veya moleküler yöntemlerle saptanan, 0,2 mm'den daha geniş olmayan tek tümör hücreleri veya küçük hücre kümeleri olarak tanımlanır. İTH, proliferasyon veya stromal reaksiyon gibi malign aktivite kanıtlarını genellikle göstermez.

Tablo 5. Meme tümör evreleri

EVRE	T	N	M
0	Tis	No	Mo
I	T1*	No	Mo
	To	N1	Mo
a	T1*	N1	Mo
II	T2	No	Mo
	T2	N1	Mo
b	T3	No	Mo
	To	N2	Mo
	T1*	N2	Mo
a	T2	N2	Mo
III	T3	N1	Mo
	T3	N2	Mo
	T4	N1-4	Mo
b	T1*-4	N3	Mo
IV	T1*-4	N1-4	M1

*: T1, T1mic'i de içerir.

3.2.1. Primer Tümör (T)

Patolojik ve klinik sınıflamalarda primer tümörün tanımlanması aynıdır. Tümör boyutu ölçümü eğer fizik muayene ile yapıldıysa, sınıflamada ana gruplar (T1, T2 veya T3), mamografik veya patolojik olarak yapıldıysa T1'in alt grupları kullanılabilir:

TX Saptanamayan primer

T0 Primer tümör yok

Tis Karsinoma in situ

Tis (DCIS) Duktal karsinoma in situ

Tis (LCIS) Lobuler karsinoma in situ

Tis (Paget) Meme başının kitlesiz Paget hastalığı

(Tümör olan Paget hastalığında sınıflama tümörün boyutuna göre yapılır.)

T1 Tümörün en büyük boyutu 2 cm veya daha az

T1mic En büyük boyutu 0.1 cm veya daha az olan mikroinvazyon

T1a En büyük boyutu 0.1 cm.den büyük olan ancak 0.5 cm.yi geçmeyen tümör

T1b En büyük boyutu 0.5 cm.den büyük olan ancak 1 cm.yi geçmeyen tümör

T1c En büyük boyutu 1 cm.den büyük olan ancak 2 cm.yi geçmeyen tümör

T2 En büyük boyutu 2 cm.den büyük olan ancak 5 cm.yi geçmeyen tümör

T3 En büyük boyutu 5 cm.den büyük olan tümör

T4 Herhangi bir boyutta ancak (a) göğüs duvarına veya (b) cilde direkt yayılım

T4a Pektoral kasa ulaşmamış göğüs duvarı yayılımı

T4b Meme cildinde ödem (portakal kabuğu görüntüsü dahil) veya ülserasyon, veya aynı memede satellit deri nodülleri

T4c T4a ve T4b birlikte

T4d İnflamatuar karsinom

3.2.2. Bölgesel Lenf Nodülleri (N)

3.2.2.1. Klinik Sınıflama

NX Saptanamayan bölgesel lenf nodları (örn. daha önce çıkartılmış)

N0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1 İpsilateral lenf nod(lar)ında metastaz (fikse değil)

N2 Fikse veya gruplaşmış ipsilateral aksiller lenf nodlarında metastaz veya klinik olarak belirgin aksiller lenf nodu metastazı olmadığı durumlarda klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal nodlarında metastaz

N2a Birbirlerine veya çevre dokulara fikse ipsilateral aksiller lenf nodlarında metastaz

N2b Sadece klinik olarak aksiller lenf nodu metastazı olmadığında klinik olarak belirgin

N3 Aksiller lenf nodu tutulumu olsun ya da olmasın ipsilateral infraklavikular lenf nod(ları) metastazı veya klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal lenf nod(ları) metastazı ile birlikte klinik olarak belirgin aksiller lenf nodu metastazı; veya aksiller ya da internal mammaryal lenf nodu metastazı olsun ya da olmasın ipsilateral supraklavikular lenf nod(ları) metastazı

N3a İpsilateral infraklavikular lenf nod(lar)ında metastaz

N3b İpsilateral internal mammaryal lenf nod(lar)ında veya aksiller lenf nod(ları)nda metastaz

N3c İpsilateral supraklaviküler lenf nod(ları)nda metastaz

3.2.2.2. Patolojik Sınıflama (pN)a

Sınıflama sentinel lenf nodu diseksiyonu uygulanan veya uygulanmayan aksiller lenf nodu diseksiyonuna göre yapılır. Ardından aksiller lenf nodu diseksiyonu uygulanmayan sentinel lenf nodu diseksiyonuna dayalı yapılan sınıflama, sentinel nod için (sn) ile belirtilir. Örneğin: pN0(i+)(sn).

pNX Saptanamayan bölgesel lenf nodları (örn. patolojik inceleme için daha önce çıkartılmış veya çıkartılmamış)

pN0 Histolojik olarak bölgesel lenf nodu metastazı olmayan, izole tümör hücreleri (ITH) için ek inceleme yok

pN0(i-) Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, negatif IHK

pN0(i+) Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, pozitif IHK, 0.2 mm.den geniş IHK kümesi yok

pN0(mol -) Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, negatif moleküler bulgular [reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)]

pN0(mol+) Histolojik bölgesel lenf nodu metastazı yok, pozitif moleküler bulgular (RT-PCR)

pN1 1-3 arası aksiller lenf nodlarında, ve/veya internal mamaryal nodlarda sentinel lenf nodu diseksiyonu ile saptanan mikroskopik hastalıkla birlikte metastaz, fakat klinik olarak belirgin değil

pN1mic Mikrometastaz (0.2 mm.den geniş, 2.0 mm.den geniş değil)

pN1a 1-3 adet aksiller lenf nodunda metastaz

pN1b Sentinel lenf nodu diseksiyonu ile internal mammaryal nodlarda mikroskopik hastalık olarak saptanan metastaz, fakat klinik olarak belirgin değil

pN1c 1-3 adet aksiller lenf nodunda ve internal mammaryal nodlarda sentinel lenf nodu diseksiyonu ile mikroskopik olarak saptanan metastaz, fakat klinik olarak belirgin değil. (3 aksiller lenf nodundan fazla pozitif nod varsa, artmış tümör yükünü göstermek için internal mammaryal lenf nodları pN3b olarak sınıflandırılır). (pN1a + pN1b)

pN2 4-9 aksiller lenf nodunda metastaz, veya aksiller lenf nodu metastazı olmadığında internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin metastaz

pN2a 4-9 aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm.den büyük en az bir tümör odağı)

pN2b Aksiller lenf nodu metastazı yokken, internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak belirgin metastaz

pN3 10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda, veya infraklaviküler lenf nodlarında, veya 1 ya da daha fazla aksiller lenf nodu pozitif olduğunda klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal lenf nodlarında metastaz; veya internal mammaryal lenf nodlarında klinik olarak negatif mikroskopik metastazla birlikte 3'ten daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz; veya ipsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz

pN3a 10 veya daha fazla aksiller lenf nodunda metastaz (2.0 mm.den büyük en az bir tümör odağı), veya infraklaviküler lenf nodlarına metastaz

pN3b 1 veya daha fazla pozitif aksiller lenf nodu varlığında klinik olarak belirgin ipsilateral internal mammaryal lenf nodu metastazı; veya sentinel lenf nodu diseksiyonuyla saptanan fakat klinik olarak belirgin olmayan mikroskopik hastalıkla birlikte 3 veya daha fazla aksiller lenf nodunda veya internal mammaryal lenf nodlarında metastaz.

pN3c ipsilateral supraklaviküler lenf nodlarında metastaz

3.2.3. Uzak Metastaz (M)

MX Uzak metastaz saptanamıyor

M0 Uzak metastaz yok

M1 Uzak metastaz var (Tümörün olduğu tarafta supraklaviküler lenf nodları ve karşı memenin bölgesel lenf nodlarına metastazlar dahil)

3.2.4. Histopatolojik Grade (G)

Meduller karsinom dışındaki tüm invazif meme kanserleri derecelendirilmelidir. Buna invazif lobuler ve müsinöz karsinomlar da dahildir.

Gx:Değerlendirilemiyor

G1: iyi diferansiye

G2: Orta derecede diferansiye

G3: Kötü Diferansiye

G4: Diferansiye olmayan

3.2.5. Rezidüel Tümör (R)

Hastada küratif amaçlı tedaviden sonra kalan tümör (örn. kür için cerrahi rezeksiyon) R sınıflaması adı altında bir sistemle sınıflanır.

RX: Rezidü tümör varlığı gösterilememektedir

R0: Rezidü tümör yok

R1: Mikroskopik rezidü tümör

R2: Makroskopik rezidü tumor

3.3. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması

Kanser dokusuna uygulanabilecek her moleküler analitik yöntem potansiyel olarak prognostik ve öngörüsül faktörleri tespit etme gücüne sahiptir. qRT-PCR ve *microarray* gibi moleküler tekniklerle gerçekleştirilen gen ekspresyon profilleri ile meme kanserinin heterojenitesini açıklama çabaları tümörün moleküler sınıflamasını gündeme soktu.

Sporadik meme kanserleri arasında gen ekspresyon farklılıklarını belirleyen ilk kapsamlı ve çığır açan girişim 2000 yılında Perou ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilerek meme tümörleri 4 ana gruba ayrıldı [9]:

- 1) Luminal hücre benzeri,
- 2) Bazal hücre benzeri,

- 3) Normal epitel benzeri ve
- 4) HER2 pozitif grup

Sonraki çalışmalarda luminal hücre benzeri grup içinde luminal A ve B olmak üzere 2 alt grup daha tanımlandı [86,87], meme kanserinin bu alt moleküler gruplarının ekspresyon farklılıkları doğrulandı [86,88-91].

Luminal hücre benzeri grubunun hepsi ER pozitifdir. Luminal A grubu en fazla ER ekspresyonu gösteren tümörlerdir [87]. Luminal B grubu tümörler luminal gruba özgü genleri orta düzeyde eksprese eder ve bazıları HER2 pozitifdir. p53 gen mutasyon sıklığı luminal A grubunda luminal B grubundan daha sıktır [92,93]. Luminal hücre benzeri grubun yaklaşık üçte ikisi düşük ya da orta düzey histolojik grade'e sahiptir, endokrin tedaviye duyarlıdır. Bazal hücre benzeri grubun %95'i ER negatifdir ve %91'i yüksek *gradedir* [94]. Bazal hücre benzeri grup aynı zamanda "triple" negatif meme kanser fenotipine sahiptir (ER negatif, PgR negatif ve HER2 negatif). Ancak bazal hücre benzeri grubun heterojen olduğu ve alt grupları içerdiği düşünülmektedir [92,93].

Farklı moleküler alt gruplarda prognozun ve kemoterapi duyarlılığının farklı olduğu gözlemlendi. Luminal hücre benzeri kanserlerin daha uzun sağ kalım oranları, bazal hücre benzeri ve HER2 pozitif tümörlerin ise birden fazla ajanla yapılan neoadjuvan tedaviye daha yüksek oranda patolojik tam yanıt verdikleri gösterildi [87,94].

Meme kanserinin moleküler alt gruplarını küçük gruplarıyla birlikte tanımlayacak standardize yöntemlerin geliştirilmesi, prognostik ve öngörülse göstergelerin çok daha büyük hasta gruplarını içeren klinik çalışmalarla birlikte denenmesi, moleküler tiplerin yeni alt gruplarının ortaya çıkmasına yol açması, bu grupların tedaviyi yönlendirmesi beklenen gelişmelerdir.

4. TÜMÖR SÜPRESÖR GENLER

4.1. Tümör Süpresör Kavramı

Bir hücreyi kansere giden yoldan koruyan genler, anti-onkogen veya tümör süpresör genler olarak isimlendirilmektedir. Bu genler mutasyona uğradıklarında veya başka bir şekilde bu genlerin işlevinde azalma söz konusu olduğunda, genellikle başka diğer genetik değişikliklerin de eşliğinde, hücre kansere doğru ilerleyebilir. Tümör süpresör genler, hücre döngüsü regülasyonu veya apoptozu teşvik etme üzerinde baskılayıcı etkisi olan proteinleri kodlarlar [95]. Tümör süpresör genler;

- Hücre döngüsünün ve dolayısıyla hücre bölünmesinin devamı üzerinde esansiyel etkili olan genleri baskırlarlar.
- DNA hasarına göre hücre döngüsünü düzenlerler.
- Onarılamayan hasarlarda apoptozu teşvik ederler.
- Hücre adhezyonunda görev alarak kontakt inhibisyonun kaybını engellerler. Bunlar metastaz süpresörler olarak da isimlendirilir [96].
- DNA tamir proteinleridir.

4.2. ATM

Ataxia Telangiectasia Mutated: Ataksi Telanjijektazi Mutant (ATM) geni, genomun 11q bölgesinde lokalize bir Ser/Thr protein kinazdır [97]. DNA çift zincir kırıklarının *Nijmegen Breakage Syndrome 1*: Nijmegen Kırılma Sendromu 1 (NBS1, Nibrin) ile hissedilmesi sonucu aktive olan ATM proteini [98], hücre siklüsünün durmasına, DNA tamirine veya apoptoza yön veren DNA kırığı kontrol noktasının aktivasyonunu başlatan anahtar proteinleri fosforlar [99]. Hedefleri arasında p53, CHK2, H2AX gibi tümör süpresör proteinler de yer alır. ATM geninde mutasyon olan hastalar için, ATM'nin BRCA1 ve ilişkili proteinleri ile fosforilasyon ilişkisi sebebiyle, meme kanseri riski artmıştır [100]. Çeşitli lösemi ve lenfoma tiplerinin de ATM hasarları ile ilişkisi gösterilmiştir [101]. Meme kanserinde, ATM lokusunda, değişen oranlarda delesyon ve metilasyon ile çok nadir oranda

somatik mutasyonlar rapor edilmiştir [102-104]. Çeşitli çalışmalar ayrıca meme kanserinde azalmış mRNA ve protein ekspresyonuna işaret etmektedir [104-106].

4.3. BRCA1

Breast Carcinoma 1: Meme Kanseri 1 (BRCA1) geni insanda genomun 17q bölgesinde lokalize olup, bir çinko parmak ve bir C-terminus domeynlerini içeren BRCA1 proteinini sentezler [107]. BRCA1, BRCA2 ve RAD51 proteinleriyle birlikte DNA çift iplik kırıklarının tamirinde rol oynar; ayrıca heterokromatin dekondeksasyonunda ve embriyo gelişimi sırasında diğer gen fonksiyonlarının regülasyonunda görev aldığı gösterilmiştir [108]. Diğer tümör süpresörler, DNA hasar sensörleri ve sinyal iletimi proteinleri ile birleşerek, BASC (BRCA1 Associated Genome Surveillance Complex) olarak isimlendirilen büyük çok alt üniteli bir protein kompleksini oluşturur [109]. Defektif BRCA1 ve BRCA2 genlerinin meme ve over kanseriyle gösterilen çok yakın ilişkisi profilaktik cerrahi önerilerini dahi getirmiştir [110].

4.4. BRCA2

Breast Carcinoma 2: Meme Kanseri 2 (BRCA2) geni, 13q'da yerleşim gösterir ve BRCA2 proteinini kodlar [111]. BRCA1 ile yapısı oldukça farklı olmasına karşılık bazı fonksiyonları ilişkilidir. BRCA2, BRCA1 ve RAD51 ile birlikte DNA çift iplik kırıklarının tamirinde rol oynar. Bazı BRCA2 genindeki varyasyonlarının başta meme kanseri olmak üzere, over, prostat, pankreas ve bazı diğer kanser türleri ile ilişkisi gösterilmiştir [112].

4.5. CASP8

Caspase 8 : Kaspaz 8 (CASP8), 2q kromozomal lokasyonda yer alır ve bir kaspaz (Cys/Asp Proteaz) olan Kaspaz 8'i kodlar. Kaspazların sıralı olarak proteolitik işlem ile proenzim halinden aktivasyonu, apoptozun başlamasında merkezi rolü oynar. CASP8 de Kaspaz 3 üzerinden etki ederek apoptozu tetikler [113]. CASP8 varyantlarının birçok kanser ile ilişkisi incelenmiş, bazı varyantların yüksek risk ile [114], bazılarının düşük risk ile [115,116], bazılarının ise ilişkisiz oldukları önerilmiştir [117-119]. CASP8 geni varyantları, meme kanseri çalışmalarında risk faktörünü belirlemede en önemli üç gen

arasındadır[120,121]. Benzer şekilde, havuz analizleri ve meta analizler de CASP8'in meme kanseri ile kuvvetli ilişkisini göstermektedir [122-124].

4.6. CD44

İnsan genomunda 11p lokalizasyonunda olan *Cluster of Differentiation 44*: Diferansiyon Kümesi 44 (CD44) veya *Indian Blood Group*: Hint Kan Grubu olarak anılan gen, CD44 antijeni isminde hücre-hücre ilişkilerinde, adezyon ve göçte görevli bir hücre yüzeyi glikoproteini kodlar [125]. CD44, bir hyaloüronik asit reseptörüdür ve aynı zamanda osteopontin, kollajen ve matris metalloproteinazları gibi başka ligandları da bağlayabilir [126]. CD44 fonksiyonu, posttranslasyonel modifikasyonlar ile kontrol edilir. Bir glikoformu olan HCELL (*Hematopoietic Cell E-Selectin/L-Selectin Ligand*), kök hücre ve lösemik blastlarda keşfedilmiş [127-130], sonrasında kanser hücrelerinde de gösterilmiştir [131-135]. Ek olarak, CD44 varyasyonları bazı meme ve prostat kanser kök hücreleri için hücre yüzey belirteci olarak rapor edilmiş [136] ve over karsinomlarında uzamış sağkalım ile ilişkilendirilmiştir [137]. Ayrıca Cd44 izoformlarının baş ve boyun bölgesindeki yassı hücreli karsinomlar ile bağlantısı gösterilmiştir [138,139].

4.7. CDH13

Cadherin 13, *Heart (H) Cadherin* veya *T-Cadherin* isimleri ile anılan *Cadherin* süperailisine ait proteini kodlayan CDH13 geni 16q lokalizasyonunda bulunmaktadır [140]. Ancak ailedeki diğer proteinlerden farklı olarak transmembran ve sitoplazmik bölgeleri yoktur ve hücre zarına GPI çapası ile bağlıdır [141,142]. Klasik *Cadherin*ler membran reseptörleridir ve hücre dışı sinyalin GTPaz veya *Catenin/Wnt* yolağını aktive ederek hücre iskeletinin yeniden organizasyonunu sağlarlar.

Ancak T-Cadherin, hücre hücre adezyonunda görev almak yerine, LDL'nin (*Low density Lipoproteins*: Düşük Yoğunluktaki Lipoproteinler) Ca^{2+} mobilizasyonu ve hücre göçünün artması üzerindeki hormon benzeri etkisinde rol alırlar [143]. Tümör hücrelerinde CDH13'ün kaybının malignite, invazif özellikler, metastaz ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [140, 144-146]. Birçok kanser türünde CDH13 düzeyinde azalma mevcuttur [147-149]. Meme kanserinde CDH13'ün promotör hipermetilasyonları ile susturulduğu [150]

ve bu belirgin metilasyon varlığının klinik ve patolojik karakteri ile ilişkisi gösterilmiştir [151]. Ayrıca metile CDH13'ün artmış metastatik potansiyel ve azalmış Tamoksifen cevabı ile de ilgisi gözlenmiştir [152]. Ayrıca HIN1 ile birlikte Östrojen Reseptörü (ER) ve HER2 statüsü ile korelasyon göstermektedir [151,153].

4.8. CDKN2A

Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A : Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A (CDKN2A) veya *Multiple Tumor Suppressor 1*: Çoklu Tümör Baskılayıcı 1 olarak da isimlendirilen gen 9p yerleşimine sahiptir ve birkaç farklı varyant protein sentezler. P16 olarak isimlendirilen alternatif varyant CDK4 kinaz inhibitörü olarak görev yapar [154,155]. Hücre döngüsünde G1'e ilerleme aşamasında rol alan CDK4 ve p53'ü düzenleyici rollere sahiptir. Pankreas adenokarsinomları, mide-özofagus kanserleri ve diğer birçok kanser tipi ile ilişkisi gösterilmiştir [156-159]. Ayrıca p16'nın değişik tipleri kanser hücre hatlarında sıklıkla gözlenmektedir [160,161]. Ayrıca dokular yaşlandıkça kök hücre proliferasyonunun azaldığı ve p16INK4a konsantrasyonunun belirgin şekilde arttığı gözlenmekte olup, doku yaşlanmasının moleküler belirteci olmaya adaydır [162,163].

4.9. CDKN2B

Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B : Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2B (CDKN2B) veya *Multiple Tumor Suppressor 2*: Çoklu Tümör Baskılayıcı 2 (MTS-2) olarak da isimlendirilen gen 9p'de CDKN2A yakınında yerleşimine sahiptir [164]. P15^{Ink4b} proteini CDK4 ve CDK6 ile kompleks oluşturarak siklin bağımlı kinazların Siklin D tarafından aktive edilmesini engeller; böylece hücre siklüsünün G1'e doğru ilerlemesini bloke eden bir hücre büyümesi düzenleyicisidir. Genin iki alternatif varyantı bildirilmiştir [164]. Meme kanseri vakalarında ve meme kanseri hücre hatlarında p15 promotör bölgelerinde belirgin oranda metilasyon varlığı bildirilmiş, ancak bu metilasyon durumu ile kanser prognozu arasında ilişki kurulamamıştır [165-167]. P15 ekspresyonu ise farklı kanser türlerinde farklı seviyelerde olup, artmış ekspresyon ise kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [168-170]. Ekspresyon değişikliklerinin ise promotör bölgedeki metilasyon ve delesyon tarzındaki mutasyonlar ile ilişkisi bildirilmiştir [167,171].

4.10. ESR1

Estrogen Receptor 1: Östrojen Reseptörü 1 (ESR1) geni 6. kromozomun uzun kolunda (6q) bulunur ve Östrojen Reseptörü alfa (ER- α) adında bir nükleer resptörü kodlar [172]. Östrojen reseptörü, cinsiyet hormonu östrojen ile aktive edilen bir transkripsiyon faktörüdür [173]. ER- α tarafından regüle edilen genlerden kodlanan birçok protein hücre siklüsü, anjiyogenez ve sağkalım mekanizmalarında görevlidir [174-177]. ER- α aynı zamanda meme kanseri için önemli bir prognositik belirteçtir. Meme kanserinde ESR1 amplifikasyonu, uzun sağkalım ile ilişkilendirilmiş [178-181] ve endokrin tedaviden fayda göreceği önerilmiştir [182-184]. Ayrıca, Bazı ESR1 varyantları ile artmış meme kanseri riski ilişkilendirilmiştir [185-187]. ESR1 promotor hipermetilasyonunun östrojen negatif meme kanseri ile ilişkisi gösterilmiştir [188]. ESR1 metilasyonu prostat kanserli hastalarda da gösterilmiş, metilasyon şiddeti ve sıklığının yaş ile orantılı arttığı belirtilmiştir [189].

4.11. GSTP1

Glutasyon S-Transferaz (GST) enzimi, birçok hidrofobik ve elektrofilik bileşenlerin glutasyon ile konjügasyonunu katalizler ve ve GST nin π (pi) sınıfı, 11. kromozomun uzun kolunda (11q) yer alan *Glutathione S-Transferase II 1* : Glutasyon S-Transferaz pi 1 (GSTP1) geni tarafından kodlanır [190].

Meme kanserinde GSTP1 ekspresyonunda değişiklikler görüldüğü, ve bunun tümörün östrojen reseptör seviyesiyle ilişkili olduğu gözlenmiştir [191-193]. GSTP1 varyantlarının meme kanserinde kötü prognoz ile ilişkisi bildirilmiştir [191,192]. GSTP1'in apoptoz ile ilişkisinin, glutatyona etkisi ile, apoptozu bloke ettiği ve hücre yaşamı dönemini uzattığı bilinen Bcl-2 [194,195] üzerinden olduğu düşünülmektedir[196,197].

4.12. MGMT

Genomun 10q pozisyonunda bulunan *O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase* (MGMT) geni MGMT adı verilen bir alkil transferazı kodlar [198]. MGMT, Guaninin 6. pozisyonundaki oksijenine bağlı alkil grubunu, Cys (sistein) içeren aktif merkezine transfer ederek, metilasyonu ve diğer alkillenmeleri hızlıca geri döndürür [199]. İnaktif MGMT geni, alkilleyen ajanların en sitotoksik hasarı olan O⁶-alkil guanin birikmesine müsaade eder;

takibinde Timidin ile yapılan yanlış eşleşme sonucu *mismatch* tamir tetiklenir ve DNA hasarı indüklenerek hücre ölümüne sebep olur [200]. Kolorektal kanserler başta olmak üzere birçok kanser türünde MGMT geninin ekspresyonunun düşük olduğu gözlenirken [201-203], meme kanserinde ekspresyon düzeyinin lenfatik tutulum, östrojen reseptörü negatifliği ve uzak metastaz ile ilişkisi gösterilmiştir [204]. Hatta, meme kanserinde prognostik belirteç olarak da önerilmiştir [202]. Ancak bazı diğer çalışmalarda ise MGMT ekspresyon durumu ile fenotipi açıklamak mümkün olmamıştır [203,205,206]. Primer meme kanserlerinde ayrıca, MGMT ve p53 ekspresyon düzeylerinin ters orantılı olduğu da gösterilmiştir [204].

4.13. MLH1

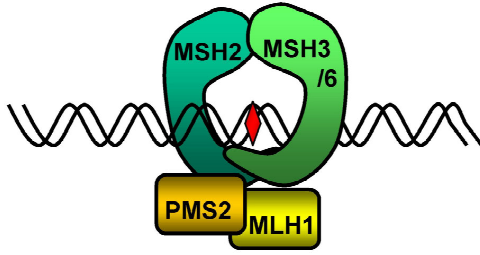
MutL Homolog 1 (MLH1) geni, insanda 3. kromozomun kısa kolunda (3p) lokalizedir ve MLH1 proteinini kodlar. MLH1 geninin bir bileşeni olduğu DNA *mismatch* tamir yolağının aktivasyonu hücre döngüsünün durmasını indükleyen duran ve hücre ölümüne yol açan bir süreç olan DNA hasarı sinyalini tetikleyebilir (Şekil 9) [207,208]. Bu mekanizmayla MLH1 ve MLH2 gibi diğer yanlış eşleşme tamir genlerinin defektif olduğu bireylerde, MGMT susturulması hücreyi alkilleyici ajanlara daha sensitif hale getirir [208]. Başta kolorektal kanserler olmak üzere birçok kanser çeşidinde MLH1 ekspresyonunun ve metilasyon durumunun kanser riski, prognozu ve tedaviye yanıtı ile ilgisi gösterilmiştir [209-211]. Sporadik meme kanserlerinde MLH1 in epigenetik olarak susturulduğu ve dolayısıyla ekspresyonunda azalma olduğu görülmektedir [212-214].

4.14. MSH6

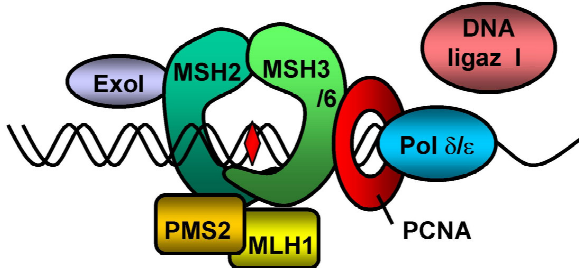
MutS Homolog 6 (MSH6) geni, insanda 2. kromozomun kısa kolunda (2p) lokalizedir ve MSH6 proteinini kodlar. MSH6 geni, DNA *mismatch* tamir yolağının bir parçasıdır ve MSH2 ile birlikte oluşturduğu aktif kompleks ile yanlış eşleşmeleri tanırlar. Daha sonra MLH1 ve PMS2 kompleksinin kırıkları tamir etmesine yardımcı olurlar (Şekil 8) [208]. MSH6, çift iplik DNA kırıklarının tamirinde görev alan BRCA1 ile de ilişki içerisindedir [215,216]. Kolon-rektum ve endometriyumda gelişen ailesel kanserler incelendiğinde MSH6 geninin mutant olduğu gözlenmiştir [217-219], ancak MSH6 mutasyonlarının, MLH1 ve MLH2'ye kıyasla daha düşük oranda ve daha geç yaşta kansere sebep verdiği belirtilmiştir

[220]. Bazı varyant genlerin ise meme kanseri ile ilişkili olmadığı söylenmiştir [221,222]. Diğer taraftan MSH6 geni mutant olmayan hastalarda, promotor hipermetilasyonuna rastlanmıştır [223] ve farklı kanser türlerinde MSH6 ekspresyonunun azaldığı hatta kaybolduğu gözlenmiştir [224,225]. MSH6 ekspresyon düzeyinin MLH1 ile ve tümör evresi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [224,225].

Kırığın tanınması



Hasarlı bölgenin onarımı



Şekil 9. DNA *mismatch* (yanlış eşleşme) tamirinde görev alan temel proteinler

4.15. PAX5

Paired Box 5: İkili Kutu 5 (PAX5) geni 9q kromozomal lokalizasyonda yer alır ve B hücrelerinde B-hücre aktivasyon proteini olarak bilinen proteini kodlar [226,227]. B-lenfositlerinde olgunlaşma sırasında sürekli olarak eksprese edilirken, plazma hücrelerinde ise azalmıştır [228]. Farede PAX5'in merkezi sinir sistemi gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir [229]. Organogenezin yanı sıra tümör oluşumunda da rol oynayan PAX5'in regülasyon bozukluğu, sinir sistemi ilişkili farklı tümör çeşitleri ile mesane kanserlerinde gösterilmiştir

[230-235]. Ayrıca PAX5 in tekrar ekspresyonunun tümör proliferasyonu, motilite, apoptoz inhibisyonu ve tümör progresyonu ile ilişkisi de gösterilmiş, bu sebeple tümör oluşumunda başlatmadan ziyade gelişimi ile ilişkili olabileceği önerilmiştir [236].

4.16. PAX6

İnsan *Paired Box 6*: İkili Kutu 6 (PAX6) geni, 11p kromozom bölgesinde yer alır ve iki DNA bağlanma bölgesini (PRD ve HD) içeren bir transkripsiyon faktörünü kodlar [237]. PAX6 gözlerin, merkezi sinir sisteminin, pankreas ve endokrin bezlerin gelişmesi için esansiyel olduğu kadar [238-240], tümör gelişiminde de rol oynar [241-243]. Pankreas kanserlerinde PAX6 ekspresyonunun azalması kanser hücresi proliferasyonunda ve Met onkojen proteini ekspresyonundaki azalmaya sebep olmaktadır [244]. Diğer taraftan glioblastoma, mesane kanseri ve prostat kanserinde promotör metilasyonu veya ekspresyon azalmasının kötü prognoz ile ilgisi gösterilmiş olup, bir tümör süpresör olarak kanser belirteci olması önerilmiştir [245-247]. Ancak PAX6'nın tümör süpresör olarak rolü komplekstir. Meme kanseri hücre hatlarındaki artmış ekspresyonu [248] ve Androjen reseptörü ile ilişkisi [247] doğrultusunda meme kanserinin gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir [244,245]. PAX6'nın silindiği farelerde, tümör hücrelerinin G0/G1 geçişini yapamadıkları gösterilmiş ve PAX6, tanısız belirteç olarak önerilmiştir [249].

4.17. PTEN

Phosphatase and Tensin Homolog: Fosfat ve Tensin Homoloğu (PTEN) geni insanda 10q genomik yerleşimi gösterir ve hem protein hem de lipit fosfataz aktivitesi ile PI3 Kinaz/Akt sinyal yolağı inhibisyonu dahil olmak üzere tümör süpresör özellikleri gösteren PTEN proteinini kodlar [250]. Bu yolak, HER2 gibi reseptörlere büyüme faktörlerinin bağlanması ile uyarılabilir. Meme kanseri dahil olmak üzere birçok insan kanserinde PTEN mutasyonlarına veya kayıplarına bağlı PI3K/Akt yolağının hiperaktivasyonunu gösterilmektedir [251]. Ayrıca Cowden Sendromu'nda, doğuştan gelen PTEN mutasyonları, meme ve over kanseri riskini arttırmaktadır [252,253]. Benzer şekilde PTEN geni mutasyonlarının meme [254], prostat [255] ve mide-özofagus kanserleri [256] ile ilişkisi gösterilmiştir. PTEN, insan kanserlerinde en çok kaybedilen tümör süpresör genlerden biridir.

Bir çalışmada, prostat kanseri vakalarında tanı anında hastaların %70'inde genin bir kopyasının kaybolduğu saptanmıştır [257].

4.18. RARB

Retinoic Acid Receptor-beta: Retinoik asit Reseptörü-beta (RAR β) geni, insanda 3p genomik lokalizasyonunda bulunur ve bir nükleer reseptör olan RAR- β proteinini kodlar. RAR- β , Tiroit-Steroid Hormon Reseptörleri süperalilesine ait bir nükleer transkripsiyon faktörüdür [258]. Reseptör, sitoplazma ve subnükleer kompartmanlarda bulunur ve A Vitamininin biyolojik olarak aktif formu olan retinoik asidi bağlayarak, embriyonik morfogenez, hücre büyümesi ve farklılaşmasında hücrel sinyallere aracılık eder [258]. Retinoik asitin hücre kültürü ve hayvan modellerinde karsinoma hücrelerinin büyümesini hem apoptoza hem de hücre siklusunda takılmaya yol açarak inhibe ettiği gözlenmiştir [259-262]. Meme kanserinde tümör süpresör gen olarak önerilen RARB geninin [263], birçok farklı kanser türünde metile olduğu veya ekspresyonunun azaldığı veya hiç olmadığı gözlenmiş [264-267] olup, bu durum ileri evre ile ilişkilendirilmiştir [268]. İnvazif meme tümörlerinde, RARB metilasyonunun lenf düğümü metastazı, yüksek proliferasyon oranı ve ileri histolojik grade ile ilişkisi gösterilmiştir [267,269].

4.19. RASSF1

İnsan genomunun 3p lokalizasyonunda yerleşik *RAS-association domain family 1* : RAS Birleşme Bölgesi Ailesi 1 (RASSF1A), hücre döngüsü kontrolü, mikrotübül stabilizasyonu, hücrel adezyon, motilite ve apoptozda görevlidir [270]. RASSF1A genleri silinen farede, mitozaya yönelimin artması, kromozom hasarları riskinin yükselmesi, artmış hücre motilitesi ve artmış tümörijenite rapor edilmiştir [271-273]. Ayrıca meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinde RASSF1A promotör bölgesinde metilasyon gözlenmiş, metilasyonun klinik ve patolojik faktörlerle ilgisi gösterilmiş [274,275] ve prognostik belirteç olarak önerilmiştir [276-283]. Meme kanserinde RASSF1A'nın promotör hipermetilasyonları ile susturulduğu [275] gözlenmiştir. Metilasyon varlığı, erken evre kanser hastalarında önemli prognostik bilgi sağlamaktadır [283].

4.20. STK11

İnsan 19. kromozomun kısa kolunda (19p) bulunan STK11 geni tarafından kodlanan *Serine/Threonine Kinase 11*: Ser/Thr Kinaz 11 (STK11), diğeri adıyla *Liver Kinase B1*: Karaciğeri Kinazı B1 (LKB1) veya *Renal Carcinoma Antigen* NY-REN-19, hücre kutuplaşmasını ve fonksiyonlarını düzenleyen, tümör süpresör özelliklere sahip bir protein kinazdır [284]. Şimdiye kadar akciğeri, serviks, meme, barsak, testis, pankreas ve cilt kökenli kanserlerde STK11 geninde birçok somatik mutasyon gösterilmiştir [285,286]. Peutz-Jegher Sendromu'nda, poliplerde, LOH zemininde gelişen iki allelin de kaybı mevcuttur [287]. Bunun yanı sıra, promotör metilasyonu ile transkripsiyonel susturma da alternatif mekanizma olarak önerilmektedir [288,289].

4.21. THBS1

Thrombospondin 1: Trombospondin 1 (THBS1, TSP1) geni, 15. kromozomun uzun kolunda (15q) yer alır ve disülfid bağı homotrimerik proteinin bir alt ünitesini kodlar [290]. Bu protein fibrinojen, fibronektin, laminin, tip V kollajen ve integrinler ile bağlanabilen ve hücre-hücre ilişkileri ile hücre-matris ilişkilerini düzenleyen bir adezyon glikoproteinidir. TSP1, ilk tanımlanan endojen anjiyogenez inhibitörüdür [291,292]. Bazı tip insan tümörlerinde sıklıkla kaybedilmiş haldeyken, deneysel tümör modellerinde de artmış ekspresyonunun tümör büyümesi, yeni damar oluşumu ve metastazı belirgin şekilde azalttığı gözlenmiştir [293]. Trombospondin, NO (nitroz oksit) tarafından uyarılmış anjiyogenez üzerinde baskılayıcı etkisi ve kan akımı değişiklikleri için hücre yüzey reseptörü CD47'ye bağlanması gereklidir [294,295]. TSP1'in hücre yüzey reseptörü CD47'ye bağlanması engellenildiğinde, tümör büyümesi yavaşlarken normal dokunun kanser radyasyon tedavisine neredeyse bağışık hale geldiği görülmüştür [296].

Bazı fare ve hücre hattı deneylerinde ise yüksek TSP1 düzeylerinin diferansiye olmayan görüntü ile ilişkisi gösterilmişken [297,298], diğeriğinde TSP1 ekspresyon artışının tümör büyümesini ve metastazı yavaşlattığı önerilmektedir [299,300]. Meme kanseri *microarray* çalışmalarında, metastatik hücrelerin, normal hücreler oranla 3 katı daha az TSP-1 eksprese ettikleri gözlenmiştir [301]. Benzer şekilde düşük TSP1 ekspresyonu artmış rekürans ve azalmış sağkalım ile birlikte [302]. Diğeri taraftan safra kesesi kanserlerinde artmış T

evresi, lenf düğümü metastazı ve venöz tutulum ile TSP1 ekspresyonunun bir arada olduğunu gösteren çalışmalar da Trombospondin'in kanser ve metastazdaki kompleks rolünü göstermektedir [303].

4.22. TIMP3

Ekstraselüler matris yıkımında görev yapan matris metalloproteinazlarını inhibe eden proteinleri kodlayan *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases 3*: Matris Metalloproteinazlarının Doku İnhibitoru 3 (TIMP3) geni, insan kromozomunda 22q da yerleşim gösterir [304]. Mitojenik stimülasyon ile TIMP3 ekspresyonunun arttığı ve proteinin ekstraselüler matrise lokalize olduğu bilinmektedir [305,306]. TIMP3 ekspresyonunun ekstraselüler matris degradasyonunu inhibe etmesinin, primer tümör büyümesi, invazyon, anjiyogenez ve uzak metastazı baskıladığı gösterilmiştir [306,307]. Meme kanseri dahil olmak üzere bazı kanser türlerinde, TIMP3 seviyesinin kanser prognozu ile ilişkili olduğu bulunmuştur [308-310].

4.23. TP53

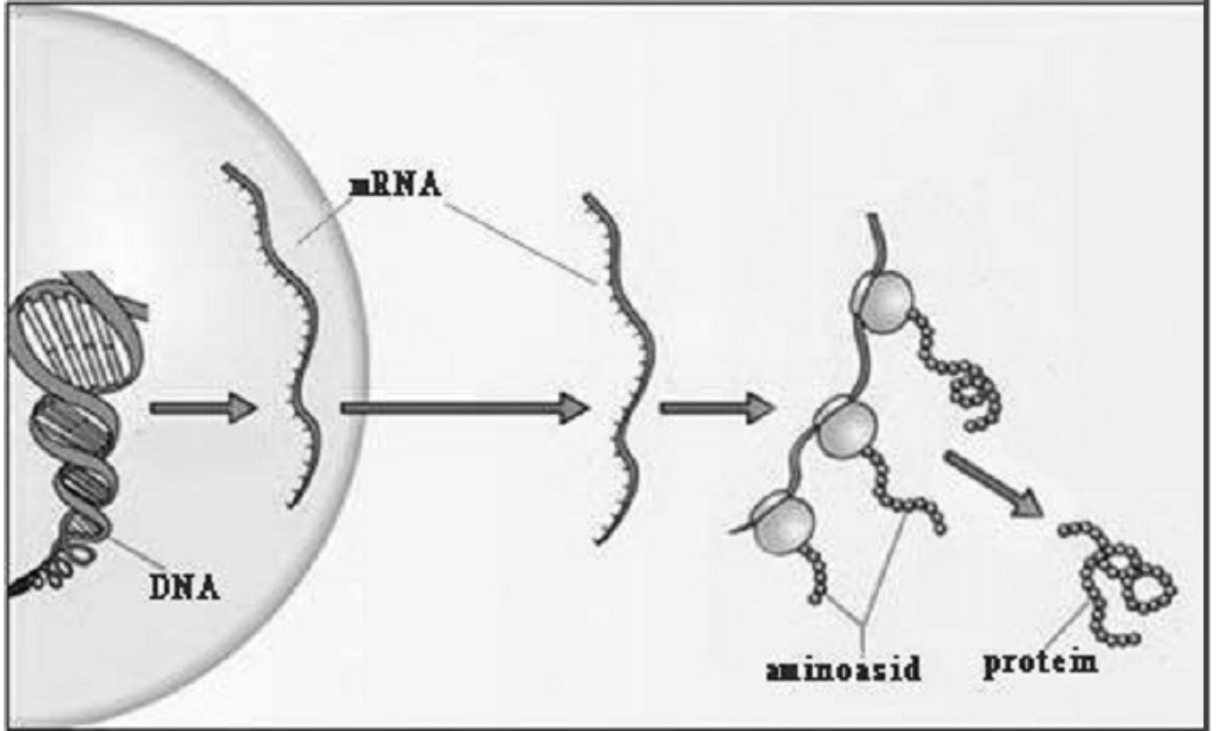
Güçlü bir transkripsiyon faktörü olan *Tumor Protein 53*: Tümör Protein 53 (TP53), 17p de yerleşim gösterir ve hücre döngüsü, DNA tamiri, apoptoz, senesens ve anjiyogenezde önemli rollere sahiptir [311,312]. Kodladığı p53 proteini, sekansa özgün bir transkripsiyon faktörü olarak temelde; p21/WAF1/CIP1 ve GADD45 gibi hücre döngüsünün durması ile ilişkili genler ile PUMA, BAX ve PIG3 gibi apoptoz indükleyici genlerin transkripsiyonunu indüklemesi üzerinden etki eder [312-314]. Ayrıca p53'ün transkripsiyondan bağımsız şekilde de apoptozu kontrol ettiği gösterilmiştir [315]. ATM, ATR gibi protein kinazlar tarafından, p53 farklı birçok bölgeden fosforlanarak, stabilitesi ve sekansa özgün aktivitesi kontrol edilmektedir [316,317]. İnsan tümörlerinin yarısından fazlasında TP53 geni mutant veya delete olduğu, dolayısıyla fonksiyonunun azalmış veya kaybolmuş olduğu gözlenmiştir [318, 319].

4.24. TP73

Birinci kromozomun kısa kolunda (1p) yerleşimi olan *Tumor Protein 73*: Tumor Protein 73 (p73) geni, p63 ve p53 ile birlikte p53 ailesini oluşturan üç genden biridir [320,321]. Gösterdiği yapısal benzerlik nedeniyle, p73 proteinin de bir tümör süpresör gen olduğu düşünülmektedir [320, 322]. Ailenin diğer üyeleri ile birlikte apoptoz yolağında etkili olduğu gösterilmiştir [323-325]. Ancak p53'ün aksine, kanserlerde p73'ün genellikle mutasyona uğramamış haldedir [326-328]. Hatta daha da ilginç, p73 defektif farelerde tümörigenik fenotip gözlenmemiştir [329]. Birçok izoformu olan p73 proteinlerinin bazı formlarının [330-333] birçok kanser türünde ekspresyonu artmış olarak gözlemlendiğinden [334-340], bazı araştırmacılar TP73 için hem tümör süpresör hem de onkojenik özellikler gösterebildiğini düşünmektedir [341, 342]. Tümör oluşumuna etkileri tartışılırken, embriyonik nöron gelişimi ve nöron apoptozu üzerinde p53'ü baskılamak suretiyle etkili olduğu, böylece de hücre diferansiyasyonu üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir [343].

5. GEN EKSPRESYONU

Gen ekspresyonu, DNA'daki bilginin proteine dönüşüm sürecinin ilk basamağını yansıtır. Her bir aşamanın sıkı şekilde denetlenmesi ve düzenlenmesiyle birlikte genel olarak DNA'daki bilgi mRNA'ya aktarılır, mRNA'daki bilgi içeriğine göre ve mRNA miktarıyla ilişkili olarak ilgili protein sentezlenir (Şekil 10). Moleküler yöntemlerden Kantitatif Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (*Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction: qRT-PCR*), bir gene özgün mRNA'nın incelenmesiyle, o genin hücre içindeki ekspresyon miktarının ölçülmesine, böylece de o genin aktivasyonu hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlar [344]. Gen ekspresyon profilleri ile kanser dokusunun davranış biçiminin anlaşılacağı kabul edilir [345].



Şekil 10. DNA'dan proteine bilgi aktarımı

5.1. Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz-PCR (*Real time* RT-PCR)

Bir genin ne kadar eksprese edildiği hakkında, o genden ilgili proteinin sentezlenmesi için kullanılacak olan özgün mRNA molekülünün miktarını ölçerek fikir sahibi olunabilir [344]. Özgün olarak bir mRNA'nın miktarını belirlemenin en kullanışlı, güvenilir ve duyarlı yollarından biri de RT-qPCR olarak adlandırılan yöntemdir. Bu yöntemde; izole edilen RNA'nın, revers (ters) transkripsiyon ile komplementer DNA'sı (cDNA) sentezlenir ve takibinde de gene özgün ve kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)'a tabi tutulur [345].

Gerçek zamanlı PCR'da her gen için tek başına ayrı ayrı kuyucuklarında gerçekleştirilen reaksiyonların özgünlüğü, o gen bölgesine ait cDNA dizisine komplementer bir çift primer kullanılarak sağlanırken; amplifikasyonu gerçek zamanlı ve özgün olarak görüntüleyebilmek için de prop ismi verilen bölgeye özgün komplementer dizide bir oligonükleotit kullanılabilir [344,346-348]. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR), *Microarray* doğrulaması, patojen kantitasyonu, transgenik kopya sayısının belirlenmesi, ilaç tedavi uygulamaları ve kanser araştırmalarında yaygın olarak kullanılır [350-354].

5.1.1. Mikrokolon ile RNA izolasyonu

Özgün mRNA moleküllerini inceleyebilmek için, kimyasal ve mekanik olarak homojenize edilen doku parçasından ortaya çıkan tüm RNA'nın izolasyonu yapılmalıdır. Bu sıklıkla, mikrokolon yöntemi diye adlandırılan, bir kaotropik tuz çözeltisi içinde çözünmüş haldeki RNA'nın, kolondaki cam (silika) elyafı parçaları içeren matrisse tutturulduktan sonra yıkanarak kontamine edicilerin arındırılması sonrası RNaz'dan temiz su içinde kolondan geri elde edilmesi yöntemi ile yapılabilir [355].

5.1.2. Abzorbans ve RNA miktarı ile saflığının belirlenmesi

A (abzorbans) değeri, çözelti içinden geçen belirtilen dalga boyundaki ışığın, ışık yolu (genellikle 10 mm) içinde çözelti tarafından soğurulması sırasında kaybettiği genliğini belirtir. Öyle ki, 0.00 değeri ışığın o dalga boyunda hiç genliğini yitirmediğini ve çözeltinin o dalga boyu için tamamen şeffaf olduğunu gösterirken, 1.00 değeri ise ışığın tamamen soğurulduğu opak bir çözeltiyi belirtir [356]. Nükleik asitlerin ışık spektrumunda morötesi (UV) tayfa denk gelen 260 nm de en üst abzorbans değerlerine sahip oldukları bilinmektedir. Yine UV

bölgeye denk gelen 280 nm dalga boyunda yapılan ikinci ölçüm ise Abzorbans-Dalgaboyu eğrisinin karakteri hakkında bilgi verirken, eğri formunun bozulması, çözeltide kontamine edici diğer organik maddelerin (bu durumda özellikle proteinlerin) varlığına işaret eder. Öyleyse A_{260nm} değeri çözeltideki nükleik asit konsantrasyonu hakkında; A_{260nm}/A_{280nm} değerleri oranı ise çözeltinin saflığı hakkında bilgi verebilecektir [357].

5.1.3. Komplementer DNA sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi, RNA molekülü kalıp olarak kullanılarak, o molekül ile komplementer sekansa sahip DNA moleküllerinin sentezlenmesidir. RNA laboratuvar çalışmaları için yeteri kadar stabil ve kolay işlenebilir olmadığı için, aynı özgün sekansa sahip ancak daha kararlı olan DNA yapısı ile çalışmak tercih edilmektedir. Bunun için MMuLVRT (moloney mürin lösemi virüsü ters transkriptazı) ile oligo-dT veya rasgele hegzamerler ile kullanılabilir [358]. Rasgele hegzamerler olarak isimlendirilen 6 bazlık nükleotitler havuzu A, G, C ve T ile oluşturulabilecek tüm hegzanükleotit dizilerini içerdiğinden, bir DNA polimeraz olan Revers transkriptaz için primer olarak kullanıldıklarında, dizi ayırt etmeden tüm RNA havuzunun kalıp olarak kullanılabilmesine imkan tanır. Oligo-dT olarak isimlendirilen TTT..T şeklindeki 12-18 bazlık oligonükleotit zincirleri de mRNA'nın 3' ucundaki poli-A kuyruğuna bağlanır ve spesifik olarak bütünlüğü bozulmamış tüm mRNA'ların kalıp olarak kullanılarak komplementer DNA'ların sentezlenmesine imkan verir [359].

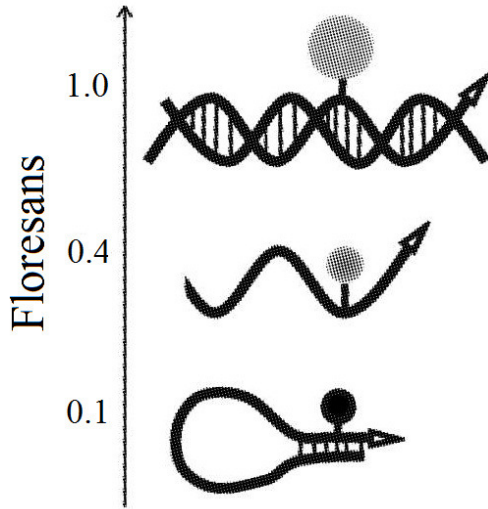
5.1.4. FRET ve Floresan Proplar

FRET (Förster rezonansı enerji transferi) prensiplerine göre tasarlanmış floresan proplar, 5' ucunda FAM ve 3' ucunda floresan söndürücü (*quencher*) moleküler işaretlere sahiptir. Ancak, FRET prensiplerine göre bu iki işaretin rezonans oluşturabilecek kadar yakın olması sebebiyle serbest halde ışımaya yapmaz [360]. PCR reaksiyonundaki bağlanma basamağında komplementer bölgelerine bağlanan proplar, üst ve alt dizilerine ilgili primerlerin bağlandığı ve gene özgün polimerizasyonun başladığı halde, DNA polimerazın ekzonükleaz aktivitesi ile kesilerek iki moleküler işaretin birbirinden ayrılması ile ışımaya yapabilir hale gelir. PCR reaksiyonu döngüleri ilerledikçe kesilerek ışımaya yapabilir hale gelen prop miktarı ekspanansiyel olarak artış gösterir ve bu floresan ışımaya genliği cihaz tarafından saptanarak

görüntülenir (Şekil 11) [361]. Cihaz tarafından saptanan bir ışımının varlığı ancak o gene ait PCR reaksiyonunun gerçekleşmesi ile olabileceğinden, ışımının varlığı o gene ait cDNA'nın varlığını ve dolayısıyla da ilgili dokuda, o gene ait mRNA'nın varlığını gösterirken, ışımının genliği de dolaylı olarak ilgili mRNA'nın miktarını gösterecektir.

5.1.5. UPL (*Universal ProbeLibrary*TM)

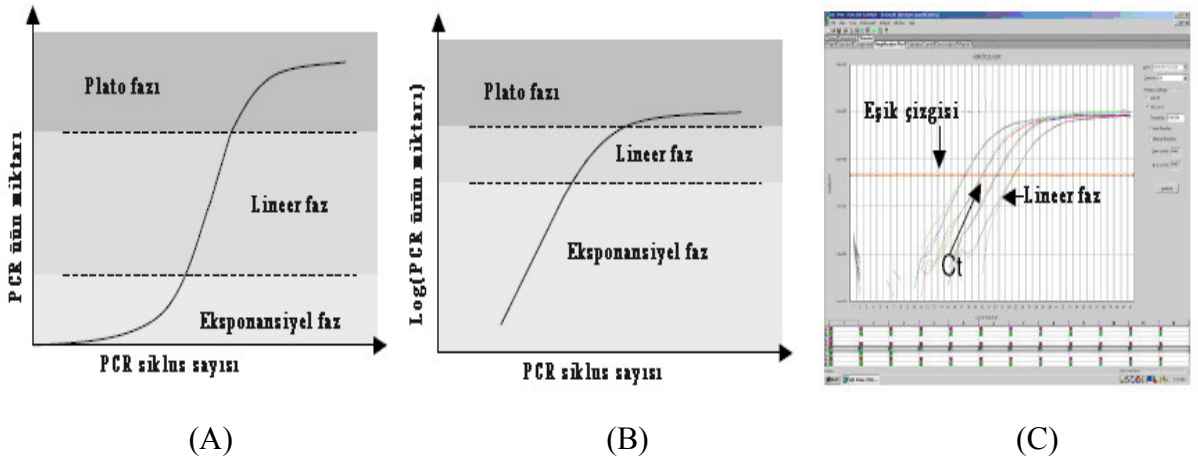
UPL(*Universal ProbeLibrary*TM: Evrensel Prop Kütüphanesi), Exiqon[®] tarafından geliştirilmiş ve ticari olarak sunulan; 8-9 nükleotit uzunluğunda ve LNA (*locked nucleic acid*) yapısında oligonükleotit zinciri olan proplardan oluşan bir kütüphanedir [362]. 90 propluk bu set ile, insan transkriptomunun %99'u incelenebilir. Kendi internet sitesindeki (www.universalprobelibrary.com) tasarım yazılımını kullanarak, 155.000'den fazlası introndan geçen toplam 639.500'den fazla testi %96'dan büyük başarı ile tasarlamak mümkündür. UPL, aynı proplar ile diğer canlıların transkriptomlarını incelemeye de olanak vermektedir. Her prop ortalama 7.000'den fazla transkript için kullanılabilen ve her transkript ortalama 19 farklı prop ile çalışılabilmekteyken, tasarım yazılımı hangi testlerin daha iyi çalışacağını da matematiksel olarak analiz ederek optimize etmektedir. Aynı zamanda tüm proplar aynı termal profile çalışabilecek şekilde tasarlanmıştır [362].



Şekil 11. FRET prensibi ile çalışan bir probun şematik gösterimi
Kendi üzerine kıvrılan prop, ışımaya yapmaz. Denatürasyon ile bir miktar ışımaya veren prop, yeni sentezlenen zincir yapısına katıldığında ise tam ışımaya yapar.

5.1.6. PCR reaksiyon dinamiği ve Ct kavramı

PCR üç fazdan oluşur: Ekspansiyonel faz, lineer faz ve plato fazı (Şekil 12) [359,363]. Ekspansiyonel faz, PCR'in en erken segmentidir. Reaktifler henüz bol olduğundan ürün ekspansiyonel olarak artar. Lineer fazda ürün lineer olarak artar, reaktifler tükenmeye başlar. Plato fazında ürün miktarı değişmez ve reaktifler tükenir. Gerçek zamanlı PCR, ekspansiyonel fazda PCR ürününün miktarı ideal koşullar altında başlangıçtaki kalıp miktarına orantılıdır [359,364]. Ekspansiyonel faz sırasında PCR ürünü verimlilik tam (%100) ise her döngüde iki katına çıkar. PCR dinamikleri tipik olarak DNA bağlayan boyalar, hidroliz ve hibridizasyon problemleri ile gözlenir [357].



Şekil 12. Şematik olarak qRT-PCR reaksiyonu verisi

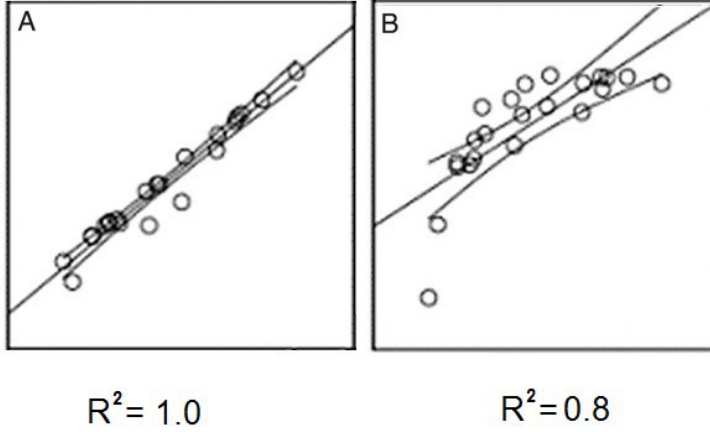
(A) PCR ürün miktarına karşı PCR döngü sayısının teorik grafiği: Ekspansiyonel faz, lineer faz ve plato fazı. (B) PCR ürün miktarının logaritmasına karşı PCR döngü sayısının teorik grafiği. (C) Seri dilüsyon deneyinin çıktısı.

Gerçek zamanlı PCR'in temeli, ampliconların sayısı ile boya arasındaki direkt pozitif ilişkidir. Şekil 12-B'de gösterildiği gibi ekspansiyonel fazdan lineer faza geçiş aşamasında ölçülen floresansın logaritması, orijinal kalıp miktarı ile koreledir. Floresans sinyalin eşik düzeyi, gürültüyü azaltmak için ayarlanabilir. Ölçülen floresans miktarının logaritmik skalada, belirlenen eşik geçtiği döngünün sıra sayısı "eşik döngüsü" (Ct) olarak tanımlanır.

5.1.7. Reaksiyon verimliliği belirteci (R^2)

Belirleyicilik katsayısı (R^2), istatistiksel modeller için, ilişkili oldukları diğer bilgiler temel alınarak, gelecek çıktıların tahminini yapmakta kullanılır. R^2 0 ile 1 arasında bir değerdir ve bir regresyon doğrusunun veri grubuna ne kadar iyi oturduğunu gösterir. Tam

1.0 değeri, verilerin doğruya en iyi şekilde oturduğu anlamına gelmektedir ve böylece gelecek verilerin de model tarafından en iyi şekilde tahmin edilebileceğini belirtir [365]. Bir dizi seri dilüsyonlar ve tekrarlar ile yapılan kantitatif PCR deneylerinde, elde edilen sonuçların R^2 değerinin 1.0'e yakın olması, deneyin tekrarlanabilirliği ve kantitasyon için tutarlılığını gösterecektir [366] (Şekil 13).



Şekil 13. Örneklerin dağılımına göre R^2 'nin durumu

5.2. PCR verilerinin Kantitasyonu

Kantitatif RT-PCR verileri absolüt veya nispi olarak kantite edilebilir. Absolüt kantitasyon tam olarak transkript kopya sayısına gereksinim olduğunda yapılırken nispi kantitasyon çoğu fizyolojik ve patolojik çalışma için yeterlidir. Nispi kantitasyon referans gene karşı hedef genin ekspresyonu ve aynı genin referans olarak alınan örneğe karşı araştırma yapılan örnek arasında karşılaştırmaya dayanır [367]. Çoğu qRT-PCR deneyleri için nispi kantitasyon yeterli olduğundan çeşitli veri analiz yöntemleri geliştirilmiştir. İki matematik modeli çok yaygın olarak kullanılır: verimliliğin kalibre edildiği model [367] ve $\Delta\Delta C_t$ modeli [368]. Her iki modelin de deney sistemleri benzerdir. Deney, kontrol örneği ve referans geni içerir. Her örnekte hedef gen ve internal kontrol olarak referans gen seri olarak seyreltilen örneklerde PCR amplifikasyon gerçekleştirilir. Tipik olarak her dilüsyon için çeşitli tekrarlar içerir. PCR amplifikasyon verimliliği ya yüzde olarak (0'dan 1'e) ya da her

döngüde artan PCR ürününün miktarı olarak (1'den 2'ye) tanımlanabilir. Verimliliğin kalibre edildiği model, daha genelleştirilmiş $\Delta\Delta Ct$ modelidir.

Amplifikasyon grafiğinden, hesaplanan Ct sayısı ile birlikte amplifikasyon grafiğinin eğimi de amplifikasyonun verimliliğini (E) verir. Her bir gen (hedef ya da referans gen) için ΔCt , kontrol örneğinin Ct'sinden araştırılan örneğin Ct'si çıkarılarak hesaplanır. Kontrole karşı tedavideki hedef genin ekspresyonunun oranı referans ΔCt 'nin (ΔCt referans) gücüne referans gen verimliliği (E referans) ve hedef ΔCt 'nin (ΔCt hedef) gücüne hedef gen verimliliği (E hedef) arasındaki orandan türetilebilir.

$$\Delta Ct (\text{hedef}) = Ct (\text{kontrol}) - Ct (\text{örnek})$$

$$\Delta Ct (\text{referans}) = Ct (\text{kontrol}) - Ct (\text{örnek})$$

$$\text{Oran} = \frac{E_{\text{hedef}}^{\Delta Ct (\text{hedef})}}{E_{\text{referans}}^{\Delta Ct (\text{referans})}}$$

Eğer hem hedef hem de referans gen en yüksek PCR amplifikasyon verimliliklerine ulaşıyorsa $\Delta\Delta Ct$ model verimliliğin kalibre edildiği modelden türetilebilir. İdeal koşullarda, hem hedef verimliliği (E_{hedef}) hem de kontrol verimliliği (E_{kontrol}) 2'ye eşit (her döngü sırasında amplikonun 2 katına çıktığını gösterir) olma durumunda oran $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olacaktır [367,368].

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{referans}) - \Delta Ct (\text{hedef})$$

Bu durumda, $E^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri hasta örneğinin normal dokuya göre kaç kat arttığı ya da azaldığını gösteren değer olacaktır [368].

5.3. Referans Genlerin Belirlenmesi ve Normalizasyon

Farklara dayanan gen ekspresyonu çalışmalarının en büyük zorluğu heterojen özellikteki doku örneklerinin nasıl normalize edileceğidir [369]. Bu aşama deneysel sürecin sonuçlarını tamamen değiştirebilen, yanlış yorumlara yol açabilen en önemli basamaktır.

Günümüzde genellikle kabul edilen; gen ekspresyon düzeylerinin hücresel giriş çıkışı, RNA kalitesi ve RT verimliliğindeki farklılıkların koşullarla değişmeden eksprese olan referans (*housekeeping* özellikteki) genlerine normalize etmektir. Bununla birlikte bu güne kadar altın standart olabilecek herhangi bir referans gen belirlenmemiştir. Daha iyi bir yöntem bulunamadığından birbirinden bağımsız hücresel fonksiyonu olan çeşitli referans genlerin analiz aşamasına geçmeden stabilitesinin kontrol edilmesi ve birden fazla genin ortalama ekspresyonunun en uygun normalizasyonu yansıttığı kabul edilmeye başlamıştır. Bu amaçla internet üzerinden serbest olarak ulaşılabilen bilgisayar programları geliştirilmiştir (*GeNorm* [370], *NormFinder* [371] gibi). *NormFinder* her bir aday referans genin stabilite değerini belirler. Bu değer, o genin normalizasyonda kullanılması durumunda ortaya çıkacak olan sistemik hatayı değerlendirmede kullanılan tahmini ekspresyon varyasyonları için direk ölçüdür. Normalizasyon için en iyi genin belirlenmesini sağlar, ne kadar küçükse o kadar stabildir [371].

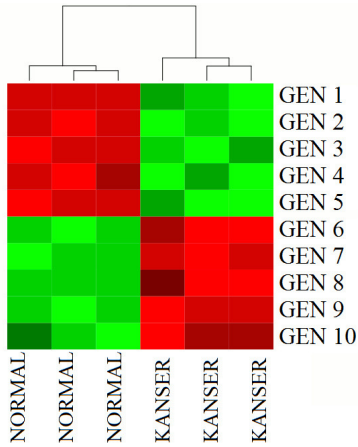
Eş koşullarda gerçekleştirilen PCR, cDNA sentezi ve RNA izolasyonu varlığında, ölçülen amplifikasyon genliklerinin doğrudan o dokudaki mRNA miktarını, yani ilgili genin ekspresyon düzeyini yansıttığı kabul edilebilir. Ancak eş koşulların sağlanması biyolojik örneklerin doğal çeşitliliğinin yanı sıra, işlemlerin eksponansiyel amplifikasyonlar içeren bir zincir reaksiyonu içermesi sebebiyle de oldukça zordur. Bu şartlar göz önünde bulundurulduğunda, ölçülen amplifikasyon genliklerinin, matematiksel olarak normalize edilmeden hemen hemen hiç bir değerinin olmadığını söylemek yanlış olmayacaktır. Normalizasyondan kasıt, eş reaksiyon şartlarının sağlanmadığı durumlar sebebiyle ölçülen değerlerin bir takım oranlama ve düzeltme işlemlerine tabi tutularak, ortaya çıkmış olan sapmaların deney grubundaki her örnek için eşitlenmesidir. Normalizasyon sonucunda elde edilen bağıl değer, gerçeğine en yakın değer olmasa dahi, tüm normalize değerlerin kendi gerçek değerlerine eş oranda yakın olması sağlanmış olur. Normalizasyon işlemi ile, aşağıda anlatılan hatalar düzeltilmiş olur:

1- *PCR verimliliklerinden kaynaklanan hatalar:* Farklı gen bölgelerini çoğaltmaya yönelik PCR reaksiyonlarının verimlilikleri farklı olabilir. Verimlilik (*E: efficiency*), PCR reaksiyonunda bir polimerizasyon döngüsü sonunda ürün miktarında ne kadar artış olduğunu belirtir. Reaksiyona giren DNA'ların o siklüs sonunda tamamının kalıp olarak kullanıldığı ve komplementlerinin sentezlendiği durum için $E = \%100 = 1.00$ olacaktır. Reaksiyonun verimliliği, primer konsantrasyonu ve kompozisyonu, çoğaltılacak gen bölgesinin dizisi, termal profil gibi birçok nedene bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Kırk döngüden oluşan iki PCR reaksiyonunun verimlilikleri %15 farklı olduğunda, başlangıç kalıp DNA miktarları aynı dahi olsa, reaksiyon sonu ürün miktarları 50 kattan fazla sapma gösterebileceğinden reaksiyon verimliliğinin belirlenerek normalizasyon için göz önünde bulundurulması çok önemlidir [368].

2- *Kalıp cDNA miktarından kaynaklanan hatalar:* PCR için ilk kalıp olarak kullanılan cDNA miktarını eşitlemek basitçe mümkün değildir. Eş büyüklükteki dokulardaki hücre miktarları yüzlerce kat farklı olabileceğinin yanı sıra, RNA izolasyonunun verimliliği bu farkları çok daha büyük boyutlara taşıyabilir. Her ne kadar cDNA sentezi için kullanılan RNA konsantrasyonları spektrofotometrik ölçüm sonrası hesaplanan dilüsyonlar ile eşitlenmeye çalışılsa dahi, izole edilen total RNA içinde büyük çoğunluğu rRNA, tRNA gibi diğer RNA'ların oluşturması sebebiyle sözkonusu ölçümler aslında mRNA konsantrasyonunu tam olarak yansıtamamaktadır. Ayrıca cDNA sentezi reaksiyonunun verimliliği kalıp RNA konsantrasyonu ve karakterine göre çok değişken olabilmektedir. İlgilenilen genin PCR sonu ürün miktarını, aynı örnekten çoğaltılan bir referans genin son ürün miktarı cinsinden bağlı olarak belirtmek, ilk kalıp konsantrasyonundan kaynaklanan farklılıkları en aza indirmek için en çok kabul gören yöntem haline gelmiştir. Burada kullanılacak olan referans gen, *housekeeping* olarak isimlendirilen, her hücrede aktif halde bulunduğu, belirli bir düzeyde ekspresyonunun olduğu ve bunun hücrenin içinde bulunduğu herhangi bir durumda büyük oranda değişiklik göstermediği genler arasından seçilir. Hatta bu genlerin dahi bazı durumlarda ekspresyon düzeylerinin değişebildiği gözlemlenmiş olup, referans olarak tek genin kullanılması hatalara sebep olabileceğinden, yeni yaklaşım birden fazla referans genin ölçümünün yapılması yönündedir. Bu genlerin düzeyleri ölçüm sonunda birbirleriyle karşılaştırılarak ortalamaları alınabilir veya sapma gösteren gen veya genler değerlendirme dışı bırakılabilir.

5.4. Ekspresyon Isı haritası (heatmap)

Özellikle *microarray* çalışmalarında ekspresyon verilerinin sayısal değerlerini görselleştirmek için sık kullanılan bir istatistiksel görselleştirme yöntemidir [372,373]. Genellikle yatay eksen örnekleri, düşey eksen ise genleri gösterir. Matrisin her bir hücresi, o hücrenin ait olduğu genin, o hücrenin ait olduğu örnekteki nispi ekspresyon seviyesini temsil edecek şekilde renklendirilir. Nispi ekspresyon seviyesi, ilgili örneğin normalize edilmiş gen ekspresyon düzeyinin aynı genin sağlıklı normal dokudaki ekspresyon düzeyine oranıdır. Kümelenen örneklerin ortalaması siyah renk ile gösterilirken, değerler ortalamadan saptıkça parlak renkler kullanılır. Bazen de siyah olarak ifade edilen referans değer farklı olabilir. Örneğin bir kanserde normalden sapmayı görselleştirmek için, ortalama yerine sağlıklı normal dokularda ölçülen değerler siyah ile ifade edilebilir. Yeşil renk tonları ekspresyon düzeyindeki artmayı gösterirken, kırmızı renk tonları ise ekspresyonun azalması anlamını taşır. Parlak renkler, soluk renklere oranla ekspresyon değişikliği miktarının daha fazla olduğunu gösterirken, siyah gözükten hücreler belirgin bir ekspresyon değişikliğinin olmadığını belirtmektedir (Şekil 14).



Şekil 14. Kanserde gen ekspresyon çalışmalarında ısı haritası gösterimi

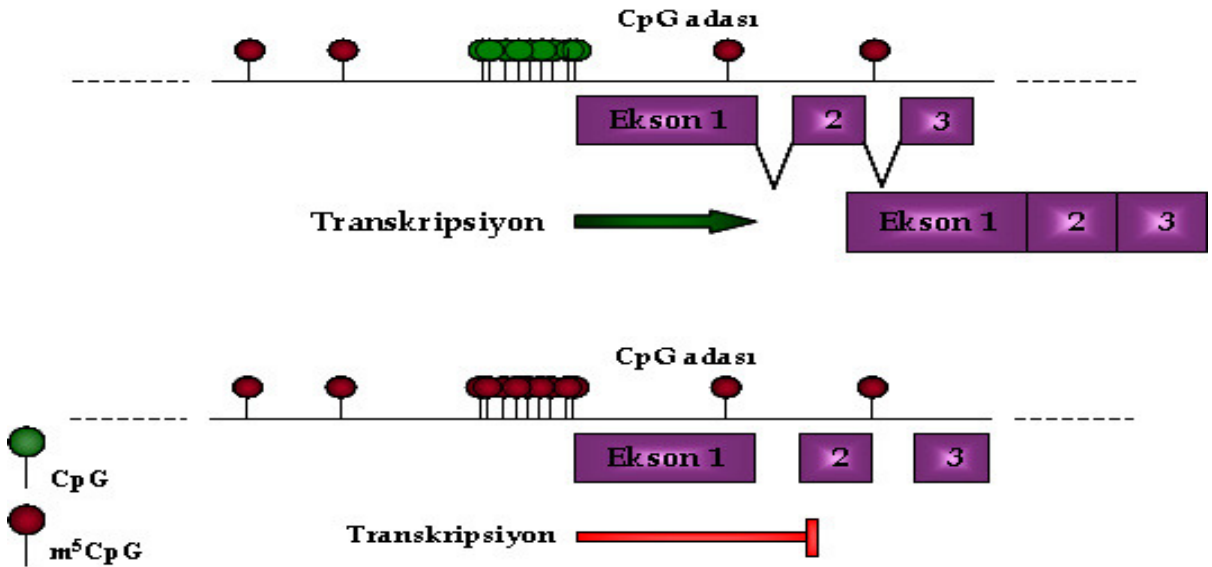
Bu örnekte kırmızı olarak gösterilen genlerin ekspresyonlarının azaldığını, yeşil olarak gözlenenlerin ise ekspresyonlarının arttığını görmekteyiz. O halde, Gen 1-5 onkogenler, Gen 6-10 tümör süpresör genler olarak düşünülebilir.

6. EPİGENETİK

6.1. DNA Hipermetilasyonu

Genetik içerikte değişikliğe neden olmadan DNA hipermetilasyonu ve histonların hipoasetilasyonu gibi epigenetik olaylar, DNA'nın ve kromozomun üç boyutlu yapısını değiştirerek gen ekspresyonunda değişiklikleri neden olan mekanizmadır [20]. Hücrelerin fonksiyonel aktivitesinde gerekli olan proteinlerin üretimindeki genel bilgi genetik şifre ile sağlanırken epigenetik bu bilginin nerede, ne zaman ve nasıl kullanılacağını belirler.

En iyi bilinen epigenetik belirteç, DNA metilasyonudur. DNA metilasyonunun gen aktivitesinin kontrolünde ve nükleusun yapısında önemli bir rolü vardır. Metilasyon, guanin nükleotitlerinin önündeki sitozinlerde meydana gelir ve bu yapı CpG ikili nükleotit olarak adlandırılır [374,375]. CpG ikili nükleotitlerinden zengin bölgeler (CpG adaları) genom boyunca bir çok genin önünde genin düzenlenmesinde önemli bölgelerde yer alır. Bu adaların belirli gruplarının metilasyonuna normal dokuda rastlansa da genellikle normal hücrelerde metile değildir [374,375]. Kısaca CpG adalarının metilasyonu; gen delesyonu ya da inaktive edici mutasyonlara eşit fonksiyon görerek genin susturulmasına neden olur (Şekil 15) [376].



Şekil 15. DNA metilasyonunun şematik gösterimi

Hücre yaşamını, proliferasyon ve diferansiyasyonunu sıkı kontrol altında tutan bir çok genin önünde CpG adası vardır. Çeşitli deneysel çalışmalar kanser hücrelerindeki anahtar genlerin transkripsiyonunda CpG adacıklarının metilasyonunun önemli rol oynadığını, metal transferaz uygulamaları ile geri döndürülebildiğini ve tedavide yeni hedef mekanizma olabileceğini gösterdi [377].

Metilasyon ile genin aktivasyonunun değiştirilmesi, Knudson'un "çift vuruş" hipotezine alternatif bir yol sunar [376]. Kanser hücre hatları ile yapılan çalışmalarda, tümör süpresör genlerde CpG adalarının metilasyonunun heterozigosite kaybıyla bağlantılı olduğu, böylece de hipermetilasyonun karsinogeneze katkısı desteklendi [378]. Bir çok kanser tipinde bir çok genin metilasyonu gösterildi [379].

Karsinogeneze, potansiyel olarak etkilenen yollarda bulunan genlerin metilasyon durumlarının meme kanserinde araştırılması, tümörün klinik davranışı ile gen veya genlerin birlikte değerlendirilmesi önemlidir. Kanser başlangıcı ve progresyonunu gösterecek epigenetik değişikliklerin tespiti, bu değişikliklerin mekanizmalarının belirlenmesine ve bu bilginin de hastalığın erken tanısına yardımcı olacağı ve hastalığı önleyici çalışmalara katkıda bulunacağı umut edilmektedir.

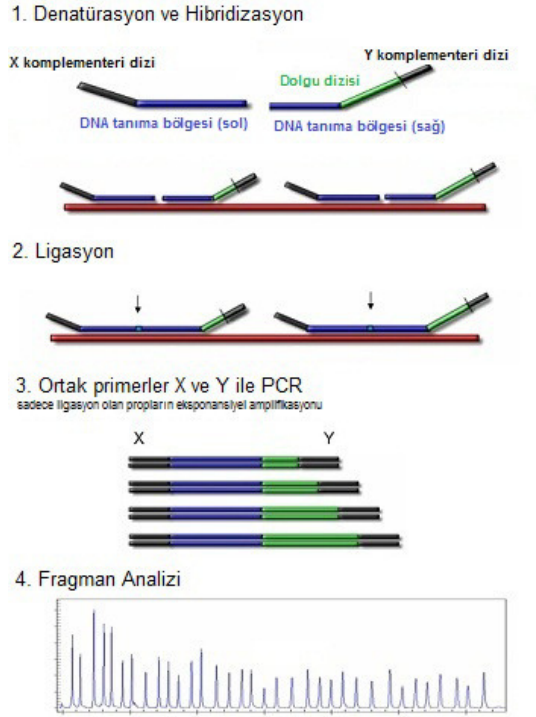
6.2. Metilasyon MLPA

Tümör süpresör genlerin promotör bölge CpG adalarının metilasyon değişikliklerinin saptanması için Metilasyona Özgün Çoklu Bağlanmış Prop Amplifikasyonu (mMLPA (*Methylation Specific Multiplex Ligated Probe Amplification*)), özgün ve hassas bir yöntemdir. MRC-Holland firmasının ticari halde sunduğu bazı tümör süpresör genleri ve bazı genlerde metilasyon durumunu incelemeye yönelik kitler ile, aynı anda 20'den fazla genin promotör bölgelerinde en çok metilasyona uğrayan bölgelerin durumlarını değerlendirmeye imkan tanımaktadır [380,381].

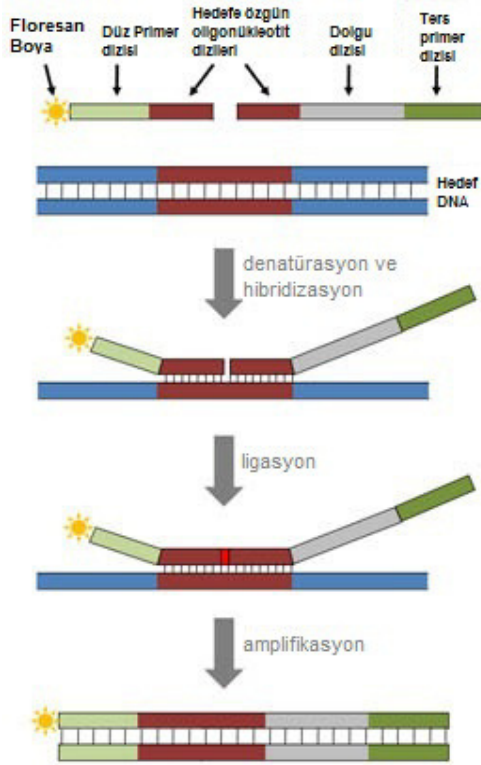
6.2.1. MLPA Reaksiyonu

MLPA reaksiyonu, kalıp DNA üzerindeki özgün dizileri tanımak üzere sentezlenmiş bir çift prop parçasının, kalıba bağlandıktan sonra Ligaz ile birbirine bağlanarak, oluşan yeni probun PCR ile amplifikasyonundan ibarettir (Şekil 16). MLPA prop parçaları 3 bölüm

içermektedir: 1. Özgün dizi (Kalıp DNA komplementeri dizi), 2. Primer Dizisi (Prop amplifikasyonu primerlerine komplementer dizi), 3. Dolgu dizisi (Şekil 17). Kalıp DNA üzerindeki özgün bölgeye, arada hiç boşluk kalmayacak şekilde yan yana bağlanan prop parçaları, DNA ligaz ile birbirine bağlanır. Böylece bir ucu düz Primer dizisi, diğer ucu ters primer dizisi olan ve arasında da sayıca bilinen dolgu dizisi kadar oligonükleotit olan yeni bir prop ortaya çıkmış olur. Ligasyonun olması, kalıp DNA üzerinde aranan sekansın varlığını göstermektedir. Burada dolgu dizisinin sekansının hiçbir anlamı yoktur. Sadece multipleks PCR reaksiyonunda, ampliconların birbirinden ayrılması ve tanınması için bir etiket görevi görmektedir. Daha sonra tek bir primer çifti ile bir PCR yapılır. Ancak bu aslında bir multipleks PCR'dır çünkü farklı büyüklüklere sahip tüm MLPA propları aynı anda çoğaltılmış olacaktır. Aynı anda 50'den fazla PCR ürünü elde edilen bu reaksiyon sonrasında ürünler, kapiller elektroforez ile fragman analizine tabi tutularak her bir probun varlığı ve miktarı incelenir [380].

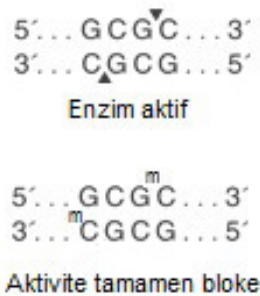


Şekil 16. MLPA reaksiyonlarının şematik gösterimi



Şekil 17. MLPA probunun yapısı ve amplifikasyonunun şematik gösterimi

Metilasyon MLPA’da MLPA iki kez yapılır [381]. Birincide bilinen şekli ile yapılırken, ikincide ise kalıp DNA metilasyona spesifik bir restriksiyon enzimi olan HhaI ile kesildikten sonra kullanılır [382]. HhaI, ATCC 10014 suşu E. Coli bakterisinden elde edilen ve 5’..GCGC..3’ dizisini spesifik olarak tanıyıp ikinci GC arasından keserken, metile sitozinlerin varlığı halinde kesim yapmaz (Şekil 18) [383].



Şekil 18. HhaI restriksiyon enziminin fonksiyonu

6.2.2. Fragman Separasyonu

PCR reaksiyonu sonrası elde edilen büyüklükleri yaklaşık 60-500 baz arasında değişen ve arasında kimi zaman sadece 4-6 baz farkı olan 50 ye yakın PCR ürününün birbirinden ayırt edilmesi için kapiller elektroforez kullanılmaktadır [380,384]. PCR ürünleri, yani MLPA prop fragmanları, 75 µm çapında bir kapiller içinde, polimer jel ortamında 4-5 KV/33 cm elektriksel alanda elektroforeze tabi tutularak, her PCR ürününün büyüklüğü ve miktarı kaydedilmektedir. PCR ürünleri floresan işaretli olduklarından, bir LASER florometre yardımı ile elektroforez süresince gerçek zamanlı olarak kaydedilmektedir. Bu sırada, farklı frekansta floresan ışımaya yapan bir *Size Standart* da eş zamanlı olarak aynı kapiller tüp içerisinde koşutulmaktadır. Bu diğer dalgaboyundaki ışımaya da florometre ile gerçek zamanlı olarak diğer kanaldan saptanarak, asıl incelenen hedef fragmanların büyüklüklerini saptayabilmek için referans olarak kullanılır. Ancak fragman separasyonu sırasında kaydedilen floresan ham veri, bir dizi parametre eşliğinde işlendikten sonra daha anlamlı hale gelecektir [385].

6.2.3. Fragman Analizi Parametreleri

6.2.3.1. Boy Standardı Düzeltmesi

Fragman büyüklüklerini Boy Standardı (*Size Standart*) referansı ile tahmin edebilmek için, elektroforezi yapılan DNA büyüklükleri, boy standardı ile oluşturulan bir standart eğriye oturtulur. Bu işlem sırasında tercih edilebilecek birden çok algoritma mevcuttur. *Local Southern* algoritmasında yaklaşık büyüklükleri, standartların mobilitesine göre değerlendirilir ve her boy standart için ona en yakın diğer dört standartın mobilitesine göre, birçok eğri çizmek suretiyle hesaplamaktadır [386].

6.2.3.2. Rölatif Pik Eşiği

Ham veri eğrisi analiz algoritması ile transforme edildikten sonra, pik olarak değerlendirilecek en küçük floresan değer, en yüksek ikinci pik değerine oranıdır. Yüzde sıfır ile %100 arası bir değer alan eşik değerinin altındaki pikler göz ardı edilir. Her boya rengi için ayrı ayrı değerlendirilir ve standartlara uygulanmaz [386].

6.2.3.3. Eğim Eğiği

Ham veri eđrisi analiz algoritması ile transforme edildikten sonra, birbirine sűperpoze olmuř iki pikin birbirinden ayrı olarak deđerlendirileceđi eđik deđerdir. Eđim, pik yűksekliđi ile orantılı olduđu kadar geniřliđine de bađlantılıdır. Bu eđiđin altındaki eđim farklılıkları tek pik olarak deđerlendirilir. Arka fon gűrűltűsűnden kurtulmak için her boya için ayrı ayrı yapılabilir ve 1 ile 1000 arası bir deđer alır [386].

6.2.3.4. Mobilite/Sűre Parametresi

Ham veri transforme edilirken X eksenini için sűrenin veya migrasyon deđerinin dikkate alınacađını gűsterir [386].

6.2.3.5. Floresan Pik Bűyűklűkleri

Floresan pik bűyűklűkleri sayısal olarak deđerlendirilirken pik yűkseklikleri veya pik eđrisi altında kalan alan řeklinde hesaplanabilir. MLPA çalıřmasındaki gibi geniř bir aralıđı kapsayan fragman bűyűklűklerinde, yalnızca pik yűksekliklerinin deđerlendirilmesi yanılıcı olabilmektedir [386].

6.2.3.6. Boya Mobilite Dűzeltmesi

Mobilite parametresinin matematiksel bir algoritmayla dűzeltilmesi gerekebilir. Aktif ester boyaları ile işaretli primerlerin ileri kalibrasyonu için Beckman Coulter tarafından sağlanan AE Ver.2 (Aktif Ester 2. versiyon) algoritması kullanılması önerilmektedir [386].

7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

7.1. Parametrik ve Parametrik Olmayan Analizler

Parametrik istatistik yöntemleri, verilerin rasgele dağılım esasına uyduğunu kabul eden ve dağılım parametrelerine göre çıkarımlar yapan yöntemleridir [387]. En iyi bilinen ilkel istatistik yöntemleri parametrik [388]. Genellikle parametrik yöntemler, parametrik olmayanlara göre daha fazla kabullenme yaparlar. Ancak bu ekstra kabullenmelerin doğru olduğu durumlarda da, parametrik yöntemler ile daha doğru ve kesin sonuçlar elde edilebilir. Bir başka deyişle, bunların istatistiksel tahmin gücü yüksektir. Ancak bu kabullenmelerin doğru olmadığı durumlarda ise parametrik yöntemlerin sonuçları gayet yanlış yönlendirici olabilir. Diğer taraftan parametrik formüller genellikle daha basit ve hızlıdır [389].

Parametrik olmayan istatistik yöntemleri ise, verinin belirli bir dağılıma ait özellikleri olmadığını kabul ederler ve rasgele dağılım parametrelerine göre kabullenmeler yapmazlar. Bu yöntemler, gözlem değerlerinin sıra sayılarını dikkate almaktadırlar. Ayrıca parametrik yöntemlerde her bir değişkenin kendi başına standart dağılım gösteren bir gruba ait olduğu, ancak bir arada sabit bir model üzerine oturması mecburiyeti olmadığı kabul edilir. Böylece model büyüyerek verinin kompleksliğine oturacak bir hal alır. Parametrik olmayan yöntemler ölçümlerin gerçek değerleri yerine yarı kantitatif seviyelerini kullanır ve genellikle sorgulanan koşul hakkında daha az bilgi sahibi olunun durumlarda kullanılır. Bu yöntemler daha az kabullenme yaptıklarından sonuçları daha sabittir. Fakat parametrik yöntemlerin kullanımına uygun durumlarda kullanıldıklarında ise istatistiksel güçleri daha zayıf olacaktır [390].

7.2. Varyans Analizi (ANOVA)

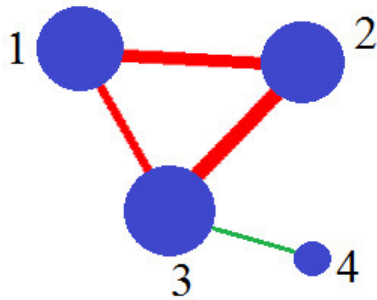
ANOVA, farklı kategorilerdeki örnek grupları arasında herhangi bir fark olup olmadığını parametrik olarak sınamakta kullanılır. ANOVA, ana kütlelerin ortalamaları arasında farkın olup olmamasını sınar. Bu durumda H_0 hipotezi, gruplar arasında değerler açısından herhangi bir fark olmadığıdır. H_0 hipotezine alternatif olan H_1 hipotezi ise, gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar olduğunu ifade etmektedir. Olasılık (*probability*) “p” değerinin 0.05’ten küçük olduğu durumlarda, H_0 hipotezini reddedilip, H_1

hipotezi kabul edilir, yani gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğunu düşünülür [391,392,393].

7.3. Korelasyon Analizi ve Ağ Şeması

İki veri grubu arasında istatistiksel bir ilişki varlığını (bağlılığı) incelemek üzere kullanılan yaklaşımlardan biri korelasyon analizidir. Amaç, iki veri grubu göz önüne alındığında benzer yönelim (artış veya azalış) gösteren grupların belirlenmesidir. Parametrik olmayan hesaplamalarda, grupların birbirleriyle olan ilişkilerini görmek amacıyla ilgili verilere uygulanan analiz sonrasında “Spearman’ın Sıralama Katsayısı” belirlenir. Gerçekleştirilen korelasyon analizleri sonucunda, her bir ilişki için -1 ile $+1$ arasında bir değere sahip olan “ ρ ” (ro) veya “ r ” ile simgelenen korelasyon katsayısı hesaplanır. Korelasyon katsayısı, değişim miktarlarından bağımsız olarak, bir değişken artarken diğeri de artıyorsa pozitif, biri artarken diğeri azalıyorsa ise negatif değerler alır. Korelasyon katsayısının $0,9-1,0$ olması çok güçlü ilişkiyi, $0,7-0,9$ olması güçlü ilişkiyi, $0,3-0,7$ orta ilişkiyi, $0,0-0,3$ ise eğer varsa zayıf ilişkiyi gösterirken, pozitif olması doğru orantı, negatif olması ise ters orantı anlamına gelmektedir [394].

Korelasyon, ağ grafiği ile gösterilerek görsel açıdan ifade edilebilir (Şekil 19). Her bir daire bir grubu temsil edecek, dairelerin çapı, diğer gruplarla olan ilişkinin sayıca fazlalığını; bağlantıların kalınlığı ise r 'nin kuvvetini gösterecek şekilde ağ grafikleri hazırlanır. Pozitif korelasyonlar, kırmızı olarak gösterilir.



Şekil 19. Korelasyon analizinde ağ şeması gösterimi

Birinci, 2. ve 3. veri grupları arasında doğru, 3. ve 4. veri grupları arasında ise ters orantı şeklinde istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon görülmektedir. En kuvvetli korelasyon ise 2. ve 3. gruplar arasındadır.

7.4. Çok Değişkenli Karşılaştırma Testleri

Korelasyon analizleri ile gruplar arasında anlamlı ilişkiler bulunan durumlarda, söz konusu benzerlik ve farkların, ilişkili değişkenlerin hangi kategorik alt gruplarından kaynaklandığı, parametrik “Multivaryat Varyans Analizi (MANOVA)” çok değişkenli karşılaştırma testleri ile incelenebilir. Böylece, “p” değerinin 0.05’ten küçük olduğu korelasyonlara sebep olan bağımsız değişken kategorileri belirlenir [391,395].

7.5. Mann Whitney U testi

Mann Whitney U testi, iki bağımsız gözlem değerinden birinin diğerinden büyük değerlere sahip olup olmadığını incelemek için kullanılır. En çok bilinen parametrik olmayan anlamlılık testlerindedir. Frank Wilcoxon tarafından eşit örneklem büyüklükleri için ortaya koyulan modelin, gelişigüzel örnek büyüklüklerini de kapsamak üzere genişletilmiş halidir [396].

7.6. Ki-Kare Testi

Ki-kare (χ^2) testi, bir seri parametrik olan ve olmayan sınaama yöntemlerinin ismidir. Ki-kare sınamalarında örneklem grubunun ki kare dağılımı gösterip göstermediği, başka bir deyişle kategorize değişkenlerin her bir kategoriye oluşturan grup içerisinde bağımsız olarak dağılım gösterip göstermedikleri sınanır. Örneğin 6 yüzlü bir zar atımının sonuçları değerlendirilirken ki kare dağılımı göstermesi beklenir. Şöyle ki; zarın her yüzü bir kategoriye belirtirken, bu kategoriler bağımsız olduklarından her kategoride eşit sayıda örnek olması beklenir. Ki-kare dağılımı gösteren gruplarda örneklem büyüdükçe grup, dağılıma o kadar yaklaşır. Genellikle "Pearson'ın ki-kare testi" en iyi bilinen ki-kare testi olup çoğu kez "ki-kare-testi" sözcüğü Pearson'un bu tip testi için kullanılır [397].

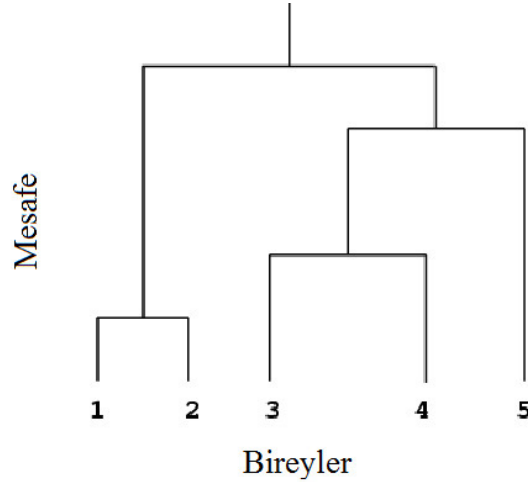
7.7. Kruskal-Wallis Testi

Kruskal-Wallis, tek yönlü varyans analizi için parametrik olmayan bir testtir. İki ya da fazla örneğin aynı dağılımdan kaynaklanıp kaynaklanmadığını inceler. Diğer bir deyişle örneklerin bağımsız veya ilişkili olduklarını gösterir. Kruskal Wallis testinin anlamlı olması, en az bir örneğin diğerlerinden farklı (büyük veya küçük) olduğunu gösterir [398].

7.8. Kümeleme Analizi ve Dendrogramlar

Elemanlarının birbiriyle hiçbir ilişkisini bilmediğimiz heterojen bir gruba, homojen alt gruplara ayırmak üzere kümeleme analizleri gerçekleştirilebilir. Kümeleme analizleri genellikle parametrik olarak öklit mesafesi, 1-korelasyon veya 1-kosinüs açısı kullanılarak veya parametrik olmayan yöntemlerle medyan sıralamasına göre yapılabilir [399].

Kümeleme sonucunu görselleştirmek için, matris kümesini oluşturan her bir elemanın küme medyanından ne kadar saptığı, ısı haritası üzerinde renkler ile ifade edilebilir. Isı haritasında medyan değerler siyah ile gösterilirken, medyandan büyük değerler yeşil, küçük değerler kırmızı ile belirtilir. Medyandan daha çok sapan değerler daha parlak olarak gösterilir. Matrisi oluşturan her bir eleman, dendritler (dallar) ile yatay ve düşey eksenlerde, birbirine en yakın özellik gösteren diğer elemana bağlanır. Bu sayede oluşan ağaç üzerinde, benzerlikleri göze alınarak hiyerarşik olarak sınıflandırılan gruplar ve örnekler, ağacın orijinine yaklaştıkça aralarındaki mesafe monoton artacak ve her bir düğümün yüksekliği de gruplar arası farklılıkları belirtecek şekilde gösterilmiş olur (Şekil 20) [399,400].



Şekil 20. Dendrogram yapısı

8. MEME KANSERİNDE MOLEKÜLER PROGNOSTİK VE PREDİKTİF TESTLER

8.1.Vücut Dışı Çok Değişken İçerikli Tanı Testleri

Nod negatif meme kanserinde adjuvan kemoterapi önerilen meme kanseri vakalarının bir bölümünün adjuvan tedavi almadan tedavi olması ve hastaların tedaviye verdikleri yanıtların farklılığı, hastaların nüks risklerine göre tanımlanmasını sağlayacak, tedaviye verilecek yanıtı öngörebilecek moleküler yaklaşımları gündeme getirdi. *Microarray* ve diğer yüksek işlem hacmine sahip deneylerde çoklu değişkenlerin test edilmesi, prognostik ve prediktif çalışmaların yürütülmesi için hem yöntemsel hem de istatistiksel değişikliklere sebep oldu. FDA (*Food and Drug Administration: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi*), 2007 yılında yayınlanan taslak kılavuzla tek bir laboratuvar tarafından geliştirilen, tek bir laboratuvarında uygulanan ve klinik laboratuvar hizmetleri olarak sunulmaya başlayan yeni genetik testleri, *In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays: Vücut Dışı Çok Değişken Endeksli Tanı Testleri (IVDMVIA)* olarak isimlendirerek, bunları düzenleme otoritesine sahip olduğunu açıkladı; böylece yeni testlerin geliştirilmesi ve klinik kullanımının yolunu açtı [10].

IVDMVIA tanımında temel olarak 3 öge yer alır:

- Gen ekspresyon farklılıkları gibi hasta örneğinde yapılan testlerin verileri,
- Bu verileri kullanarak elde edilen algoritma,
- Algoritma ile elde edilen skorlamaya göre hasta sonucunun yorumlanarak klinisyene ulaştırılması [10].

Genetik testlerin dahil olduğu bir testin, laboratuvarları ve testleri denetleyen kuruluşlar tarafından onay alabilmesi için, testin analitik geçerliliği, klinik geçerliliği, klinik yararlılığı ve etik/yasal/duygusal etkilerinin tartışılıp kanıta dayalı olarak gösterilmesi beklenir. Kurumun güncel düşüncelerini yansıtan önerilerden oluşan FDA taslak kılavuzu, IVDMVIA olarak geliştirilen testlerin klinik yararlılığını sorgulamaz fakat analitik ve klinik geçerliliklerini denetler [401]. Prognostik testlerin onayı için kullanılır, öngörülmesi testleri denetlemez.

Gen ekspresyon farklılıklarını prognostik veya öngörüs el belirteç olarak kullanan IVDMVIA'ların geliştirilmesi terap dik ilaç geliştirilmesine benzetilebilir. Bu tasarıda faz I çalışmasının amacı iyi tanımlanmış grupta en uygun hasta sayısıyla belirteç keşfi ve uygun sınır değerlerin belirlenmesidir. Faz II çalışmasında testin performansı faz I'in gerçekleştirildiği hasta örneklerinin dışındaki bağımsız örneklerle  l l r. Eğer yöntem uygunsa bu iki süreç arşiv örneklerinde gerçekleştirilebilir. Faz III, prospektif olarak y r t len randomize klinik çalışmayı içerir. Bu aşamada testin kullanımının ardından verilecek olan klinik kararın bu test sonucu olmadan verilen klinik karardan daha iyi sonuç verdiğini göstermek amaçlanır.

Meme kanseri tedavi kararını etkileyebilecek hastaları nüks riskine göre gruplandırmayı amaçlayan Oncotype DX (Genomic Health, California), MammaPrint (Agendia BV, Netherlands), ve H/I (AvariaDX, California) IVDMVA tanımına giren Faz I ve II'yi tamamlayan ve Faz III çalışmalarını başlatan, klinik uygulamaya sunulan örnek testlerdendir [402].

8.2. H/I Endeksi

H/I (*HOXB1* /*IL17BR*) iki gen ekspresyon indeksi, parafin doku örneklerinde çalışılan prognostik qRT-PCR testidir [394]. *HOXB13* gen ekspresyonu neoplastik meme dokusunda artarken *IL17BR* gen ekspresyonu meme kanserlerinde azalır [403-405]. *HOXB13* geninin hücre motilitesi ve invazyon ile ilişkili olduğu, *IL17BR* geninin ise immun yanıtta rol aldığı düşünülür. Nüks riskini değerlendiren prognostik bir testtir. Geniş ve heterojen hasta örneklerinde gerçekleştirilen araştırmalarla testin prognostik gücü gösterildi. CLIA (*Clinical Laboratory Improvement Amendments*) tarafından prognostik test olarak onay aldı [406].

8.3. Oncotype DX

Oncotype DX erken evre ER pozitif meme kanserinde uygulanan 21 geni içeren formalinle fikse edilmiş parafinli doku örneklerinde (FFPE)  alışılan prognostik ve  ng r sel qRT-PCR testidir [407]. ER genini, ER ile düzenlenen çeşitli genleri, HER2 ve proliferasyonla ilgili genlerin ekspresyonunu  l er. Tamoksifen tedavisi alan ER pozitif, nod negatif meme kanserini nüks olasılığına göre düşük, orta ve yüksek riskli olmak üzere  

gruba ayırır [407]. Bu prognostik özelliğın yanında, düşük risk grubundaki hastalara yalnız endokrin tedavi, yüksek riskli hastalara endokrin tedavinin yanında adjuvan kemoterapinin önerildiğı tek testtir [408]. TAILORx, Amerika ve Kanada'da yürütölen ER pozitif, HER2 negatif 10.000 erken evre meme kanseri hastasını incelemeyi hedefleyen Oncotype DX faz III çalışmasıdır [409]. Hastalar Oncotype DX testi ile düşük (nüks skoru <11), orta (nüks skoru 11-25) ve yüksek (nüks skoru >25) nüks gruplarına ayrılır. Düşük risk grubu hastalar yalnız hormonoterapi, yüksek risk grubu hastalar ise kemoterapi ve hormonoterapi alır. Orta risk grubu hastalar tümör büyüklüğü ve menopozal duruma göre gruplandırılır, tedavi seçimi ya kemoterapi ve hormonoterapi birlikte, ya da yalnız hormonoterapi şeklinde randomize yapılır. Çalışmanın ana amacı orta risk grubu hastaların seçilen tedavi rejimlerinin sonuçlarını karşılaştırmak, düşük risk grubu hastaların tedavisinde tek başına alınan hormonoterapinin etkinliğini belirlemektir.

8.4. MammaPrint

MammaPrint nod negatif, ER pozitif meme kanseri taze ya da frozen doku örneklerinde çalışılan, *microarray* temelli 70 gen profilidir [410]. Analizini gerçekleştirdiğı profilde esas olarak proliferasyon, invazyon, metastaz, stromal bütönlük ve anjiyogenez ile birlikte olan genler vardır. Test IVDMVIA sınıfında, prognostik test olarak ilk FDA onayı alan testtir. Test cerrahi olarak çıkarılan doku örneğinde 70 genin ekspresyon düzeylerini ölçer ve 10 yıllık süre içinde uzak metastaz olasılığına göre hastaları yüksek ve düşük riskli olarak gruplandırır [410,411]. St. Gallen prognostik kriterleri ile karşılaştırıldığında MammaPrint ile tanımlanan yüksek riskli hastaların St. Galen kriterleri ile tanımlanan yüksek riskli hastalardan daha fazla oranda metastaz gösterdikleri, yine MammaPrint ile düşük riskli gruba giren hastaların St. Galen kriterleri ile tanımlanan düşük riskli hastalardan daha fazla oranda hastalısız sağ kalıma sahip oldukları gösterildi [412]. Çeşitli tedavi protokollerine duyarlılık öngörü gücü henüz araştırılmadı [413]. MINDACT, yaşları 18-70 yaş arası hormon reseptör ve HER2 durumuna bakmaksızın erken evre meme kanseri 6.000 kadın hasta ile randomize, çok merkezli, prospektif, Avrupa'da yürütölen MammaPrint faz III çalışmasıdır [414]. Hasta grubunda adjuvan kemoterapi uygulanacak hastaların belirlenmesinde direk olarak MammaPrint ve Adjuvant Online'nı karşılaştırmak üzere kurgulandı. Adjuvant Online kriterleri ve MammaPrint ile düşük risk grubu hastalar uygunsa hormonoterapi alır, adjuvan

kemoterapi almaz. Her iki düzencele de yüksek risk grubuna giren hastalar kemoterapi ve uygunsu hormonoterapi alır. Risk grubu tam belirlenemeyen hastalar ise randomize seçilerek iki algoritmadan birine göre tedavi alır. MammaPrint ile düşük risk grubundaki hastaların adjuvan kemoterapi almaksızın 5 yıl uzak metastazsız sağkalım oranlarının yüksek olması öngörülerek kemoterapinin toksik etkilerinden kurtulacak hasta grubunu belirlemek amaçlanır [415].

8.5. Vücut Dışı Çok Değişken İçerikli Tanı Testlerinin Güncel Durumu

Oncotype DX ve MammaPrint farklı test yöntemlerini kullanan testlerdir. Her iki testte tek gen ortaktır. Bununla birlikte her iki testin de genleri proliferasyon, ER ve HER2 yolaklarında bulunur. MammaPrint, Oncotype DX testin sağlayabildiklerinden daha fazla farmokogenetik bilgi sağlayabilir ve ek yolakları değerlendirme şansı yaratabilir. MammaPrint'in hasta grubu içinde hem ER pozitif hem de ER negatif hastaların olması nedeniyle *oncotype DX*'den daha geniş endikasyonu vardır ve daha heterojen gruplarda araştırma yapılabilmektedir. Oncotype DX'in hemen hemen tüm çalışmaları satın alınan testlerin kullanılmasıyla, MammaPrint verileri ise deneysel çalışmalardan elde edildi. Oncotype DX test FDA onayından muaf olmasına rağmen MammaPrint onay aldı [412]. Oncotype DX CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) tarafından onaylandı. Oncotype DX ASCO Meme Kanseri Tümör Belirteçleri Komitesi tarafından “kullanım için tavsiye edilen” test sınıfında yer alırken, MammaPrint “araştırma altında” olarak sınıflandırıldı [415]. Her iki test için de bilimsel geçerlilik, klinik fayda ve maliyet etkinlik oranları ile ilgili araştırmalar halen devam etmektedir. Yakın zamanda TAILORx ve MINDACT gibi başlamış çalışmaların testlerin klinik değerleri hakkında bilgi vereceği beklenmektedir.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

1. ARAŞTIRMANIN TİPİ

Bu çalışma, çapraz kontrollü deneysel yöntemler kullanan kesitsel özellikte bir çalışmadır.

2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI

Bu çalışma, 2006-2010 yılları arasında İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi Patoloji ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik anabilim dalları ile İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Anabilim dalı, Adana Çukurova Üniversitesi Biyokimya ve Parazitoloji Anabilim dalları ile Adana Hemoglobin derneği, Solar Grup ve Genoma Tıp Teknolojileri laboratuvarlarında yapılan deneysel analitik faaliyetler ile Ankara AG Biyoinformatik ve İzmir Üniversitesi Biyoistatistik anabilim dallarında yapılan istatistiksel değerlendirmelerin bir sonucudur.

3. ARAŞTIRMANIN EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ

Bu çalışmada meme kanseri dokularının karakteri incelenmiş olup, evren tüm invazif meme kanseri dokularıdır. Örneklem seçilirken, çalışmaya zaman ve bütçenin elverdiği ölçüde yazılı onam veren tüm hastalar dahil edilmiştir.

4. ÇALIŞMA MATERYALİ

Bu çalışmada kullanılan tüm hasta örnekleri, Dokuz Eylül Meme Tümör Grubu tarafından meme tümörü tanısı alıp, tedavi ve takipleri yapılan olgulardan oluşturulmaya başlanan Dokuz Eylül Üniversitesi Meme Tümör Biyobankası (DEMTB)'ndan sağlandı [416]. DEMTB'dan sağlanan 26 tümör dokusu, 18 komşu normal doku ve ayrıca, İzmir Özel Dr. Cevdet Tuğrul Meme hastalıkları Teşhis ve Tedavi Merkezi'nde gerçekleştirilen estetik amaçlı meme redüksiyon ameliyatı sırasında gönüllü onam formunu imzalayan dört sağlıklı bireyden alınan meme dokusu örnekleri de sağlıklı kontrol grubuna dahil edildi.

Toplam 26 kişinin patolojik tanıları ve klinik evreleri, biyobanka klinik veri tabanından ve sağlıklı kontrollerin doldurduğu anket formlarından elde edildi.

Ancak çalışma sonunda, bu olgulardan 20 tümör, 5 komşu normal ve 3 sağlıklı doku olmak üzere toplam 23 kişiden 28 doku değerlendirilmeye alınabildi.

5. ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ

Ölçülen qRT-PCR ve mMLPA verileri bağımsız değişkenler olup, prediktif ve prognostik verileri ile hasta demografik bilgileri bağımlı değişkenler olarak tahmin edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca çapraz kontrollü deneysel analiz yöntemleri kullanılan çalışmada, referans genler iç kontrol, sağlıklı normal bireylerin ölçüm sonuçları ise kontrol olarak kullanılmıştır.

6. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

6.1. DEÜ Meme Tumor Biyobankası

DEMTB, “*European Society of Human Genetics*” esaslarına göre Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik ve Laboratuvar Araştırma Etik Kurulu 30.11.2004 tarih 01/15/04 – 559 nolu toplantısında alınan rapor dahilinde pilot çalışma olarak kurulmuş olup, 2005-2007 tarihleri arasında, Dokuz Eylül Hastanesi ve Genel Cerrahi bölümünce opere olmuş ve Meme Tumor Grubunca izlenmiş hastalardan, bu çalışmaya katılmak için onam vermiş olan; insizyonel, eksizyonel veya mastektomi ile alınan biyopsileri sonucu Dokuz Eylül Hastanesi Patoloji Bölümü tarafından meme karsinomu olarak rapor edilen 69 farklı olgudan 67 adet tumor ve 51 adet çevre normal doku olmak üzere toplam 118 hasta örneğini saklamaktaydı.

Tumor doku örnekleri biyopsi materyalinde makroskopik olarak tumor odağı içinde kalan kısımdan alınırken, mümkün olduğu durumlarda tumor komşuluğunda olup makroskopik olarak normal meme dokusu özellikleri gösteren kısımdan da çevre normal doku örnekleri alınmıştı. Doku örnekleri taze doku halinde -85°C de dondurulmuş halde saklanmaktaydı.

6.2. Demografik Veriler

Hasta demografik verileri, biyobanka klinik veri tabanından elde edildi. Üreme durumu ile ilgili bilgiler (Menapoz durumu, Menarş yaşı, Gebelik Sayısı), Soygeçmiş (Ailede Kanser Hikayesi, Ailede Meme Kanseri Hikayesi) ve Patolojik Tanımlayıcı ve Prognostik Faktörlerden (Histolojik Tip, Evre, Nükleer Grade, Mitotik Aktivite, T Grubu, Lenf Nodu invazyonu, Uzak Metastaz, Östrojen Reseptörü, HER2 Reseptörü) oluşan bir demografik veri listesi yapıldı. Histopatolojik ve cerrahi sınıflandırmalar Patoloji bölümü tarafından WHO ve AJCC kanser evreleme önerilerine göre yapılmıştı [8,70,76]. Östrojen reseptör durumu immunohistokimya (IHC) ile, HER2 immunostain ile boyanarak değerlendirilmişti. HER2 için 3 pozitif (+++) üzeri ekspresyon, pozitif olarak kabul edilerek gruplandı.

Demografik veri listesine sayısal değerler doğrudan aktarılırken, sayısal değeri

olmayan kategorik verilerde, kategori isimleri rakamlar ile ifade edildi. Ailede kanser hikayesi ve ailede meme kanseri hikayesi: “1:yok, 2:var”; Histolojik tip: “1: duktal, 2: lobüler, 3: duktal+lobüler (miks), 4: nadir diğer, 5: normal”; T grubu: “1: <2 cm, 2:>2cm”; lenf düğümü invazyonu: “1:invazyon yok, 2: invazyon var”; uzak metastaz: “1:metastaz yok, 2: metastaz var”; östrojen reseptörü: “1: negatif, 2: pozitif”; HER2 reseptörü: “1: negatif, 2: pozitif” şeklinde kaydedildi.

6.3. İncelenen Genler

Meme kanseri ile olduğu kadar birçok kanser türü ile de ilişkili olduğu gösterilen ve Tümör Supresör özelliğe sahip genlerden bazıları incelendi. Bu genlerin seçilirken, metilasyon incelemeleri için çalışma kolaylığı sağlaması açısından birlikte çalışılabilecek şekilde ticari olarak kit halinde sunulan genler tercih edildi. Çalışmaya dahil edilen örneklerde ekspresyon düzeyleri ve promotor bölge metilasyon durumları incelenecek olan genler aşağıda listelenmiştir:

1. ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*)
2. BRCA1 (*Breast carcinoma 1*)
3. BRCA2 (*Breast carcinoma 2*)
4. CASP8 (*Caspase 8*)
5. CD44 (*Cluster of differentiation 44*)
6. CDH13 (*Cadherin 13*)
7. CDKN2A (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/ p16*)
8. CDKN2B (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B/ p15*)
9. ESR1 (*Estrogen receptor 1*)
10. GSTP1 (*Glutathione S-transferase P*)
11. MGMT (*Methyl guanine DNA methyl transferase*)
12. MLH1 (*MutL homolog 1*)
13. MSH6 (*MutS Homolog 6*)
14. PAX5 (*Paired box gene 5*)
15. PAX6 (*Paired box gene 6*)

16. PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*)
17. RARB (*Retinoic acid receptor beta*)
18. RASSF1 (*Ras association domain-containing protein 1*)
19. STK11 (*Serine/threonine kinase 11*)
20. THBS1 (*Thrombospondin 1*)
21. TIMP3 (*Tissue inhibitor of metalloproteinases 3*)
22. TP53 (*Tumor Protein 53*)
23. TP73 (*Tumor Protein 73*)

Ayrıca, gen ekspresyon çalışmalarında referans olarak kullanılmak üzere, literatürde meme ve diğer kanserlerdeki RT-PCR (Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) çalışmalarında tercih edilen gen bölgelerinden aşağıda listelenen dört *housekeeping* gen bölgesi de incelenmiştir [417,418]:

1. ACTB (*Beta actin*)
2. B2M (*Beta 2 microglobulin*)
3. PUM1 (*Drosophila pumilia homolog 1*)
4. RPL13A (*Ribosomal protein 13A*)

6.4. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, gen ekspresyon düzeyini belirlemek için dokulardan yapılan RNA izolasyonunun ardından, RT-qPCR (*Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction*: Ters Transkriptaz- Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi kullanıldı.

6.4.1. RNA İzolasyonu

İzolasyonlar, silika membran/kolon teknolojisi kullanılarak çoklu gruplar halinde gerçekleştirilmiş olup, porsiyonize halde -85°C’de saklanmaktaydı. Çalışma için bu porsiyonlar yetersiz kalacağı için, dondurulmuş taze doku örneklerinden Trizol kullanılarak yeniden RNA izole edildi. Tüm izolatlar spektrofotometrik ölçümler ve mütakip seyreltmeler ile yaklaşık 150 ng/µl eş konsantrasyonda RNA içerecek şekilde hazırlandı.

Hem tümör hem de komşu normal doku örneklerinden RNA eldesinde Guanidinyum

tiyosiyanat-fenol-kloroform (TRIzol®) ile organik ayrıştırma ve presipitasyon yöntemi kullanılmıştır. Yaklaşık 10 mg dokudan ortalama 30-40 µg RNA elde edilebilen bu yöntem, RNA izolasyon yöntemleri arasında nispeten yavaş bir yöntem olmasına rağmen yüksek verimi ve düşük maliyeti sebebiyle tercih edilmiştir. Dokudan TRIzol® ile organik ayrıştırma ve presipitasyon yöntemi için izlenen protokol aşağıda anlatılmıştır:

6.4.1.1. Trizol ile RNA izolasyonu:

Trizol ile RNA izolasyonu şu şekilde yapıldı:

1. Konik uçlu 2 ml'lik tüplere bistirü ile doğranmış yaklaşık 50 mg doku ve 1 ml Trizol eklendi.
2. Trizol'deki tümör örneği mekanik steril *dispenser* ile homojenize edildi. Homojenizasyon homojen solüsyon elde edinceye kadar uygulandı. Homojenat ara ara elde girdap oluşturularak yavaşça karıştırılarak 10-15 dakika oda ısısında bekletildi.
3. 4°C'de 5-10 dakika 12.000g (10.000rpm) santrifüj edildi.
4. Pastör pipeti kullanarak üstteki yağ tabakası alındı (Bu tabaka sarımsı, Trizol homojenat kırmızımsı görülür).
5. Kullanılan 1ml Trizol için 0,2 ml kloroform eklendi. Elde tüp kuvvetlice karıştırıldı ve oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.
6. 4°C'de 15 dakika 12.000g'de santrifüje edildi.
7. Üstteki total RNA'yı içeren su kıvamındaki sıvı dikkatlice yeni bir tüpe transfer edildi.
8. Üzerine kullanılan her 1ml Trizol için 0,5 ml izopropil alkol eklenerek tüp alt üst edildi. Oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
9. 4°C'de 10 dakika 12.000g'de santrifüje edildi.
10. RNA peleti üzerindeki süpernatant atıldı.
11. Pelet üzerine kullanılan her 1ml Trizol için 1 ml %75'lik Etanol eklendi. Kısaca vortekslendi.
12. 4°C'de 5 dakika 7.500g'de santrifüje edildi, süpernatant atıldı.
13. Son iki basamak, ikişer kez daha tekrarlandı.
14. Pelet, 15-20 dakika havada kurutuldu.
15. 100 µl RNaz içermeyen su eklendi.
16. Pipetleme ile karıştırılarak pelet eritildi.

6.4.1.2. RNA miktarının ve saflığının belirlenmesi

50 mg dokudan gerçekleştirilen RNA izolasyonu sonrasında, her bir örnekten elde edilen RNA çözeltileri için spektrofotometre (UV-1700, Shimadzu, Kyoto, Japan) kullanılarak 260 ve 280 nm dalga boyunda Abzorbans ölçümleri yapılarak, çözeltilerin nicelik ve niteliksel değerleri belirlendi.

Konsantrasyon hesabı sonrasında, hesaplanan dilüsyonlar yapılarak RNA için son konsantrasyonun her bir örnekte aynı ve 100 ng/μl olması sağlandı. Seyreltme işlemi için RNaz içermeyen saf su kullanıldı.

6.4.1.3. Mikrokolon Yöntemi ile RNA izolasyonu

Elde edilen RNA kalitesi kötü olanlarda pürifikasyon, gerekli tüm kimyasalların ticari kit halinde bir arada sağlandığı bir mikrokolon yöntemi ile tekrarlandı (Real Genomics-RNA (tissue), RBC BioScience, Taipei, Taiwan). İzolasyon için yaklaşık 1 mg doku kullanıldı.

RNA izolasyonu prosedürünün detayları aşağıda belirtilmiştir:

1. 1 mg doku parçası kesilerek, eğer var ise yağlı parçası diseke edilerek atıldı. Doku temiz bistüri ucu ile 10-20 parçaya kesildi.
2. 1,5 ml konik dipli mikrotüp içine konan doku parçasının üzerine 400 μl RB tamponu (%1 β-merkaptoetanol eklenmiş hali ile lizis tamponu) eklendi ve en az 5 dk. beklendi.
3. Konik uçlu plastik mikrohomenizatör kullanılarak, en az 5 dk. manüel olarak mekanik homejenizasyonu yapıldı.
4. Filtre kolonuna yüklenen homojenizat, tam devirde (12.000 rpm) 2 dk. santrifüjlendi. Filtrat alınarak hacminin yarısı kadar (200 μl) %70 etanol eklenerek pipetlemeyle karıştırıldı. Bu şekilde, serbestleşen RNA'nın çözünürlüğünün azaltıldı.
5. Tüm karışım cam elyafı matris içeren RB kolona yüklendi. Tam devirde 2 dk. santrifüjlenerek, RNA kolona hapsedildi.
6. Kolonun elyaf matris içeren üst kısmı yeni bir 2 ml mikrotüpe alındı ve 400 μl W1 yıkama tamponu eklenerek, 1 dk. tam devirde santrifüjleme ile yıkandı.
7. Yıkama işlemi bu kez de 600 μl (%80 etanol içeren) Wash Buffer yıkama tamponu ile ve 1 dk. santrifüjleme ile tekrarlandı.
8. Tam devirde 3 dk. ek santrifüjleme yapılarak membranın iyice kuruması sağlandı.
9. Temiz bir 2 ml tüp içine alınan kolona, 50 μl Rnaz içermeyen su eklendi. 3 dk

bekleme sonrasında 1 dk. tam devirde santrifüjleme ile saflaştırılan RNA, 50 µl su içinde elde edildi.

6.4.2. *Komplementer DNA sentezi*

Bu basamak için MMuLVRT (moloney mürin lösemi virüsü ters transkriptazı) içeren cDNA sentez kiti ve rasgele hegzamerler ile kullanıldı (Revertaid First Strand, Fermentas, Thermofisher Scientific Inc., Barrington, IL, USA). Reaksiyon şu şekilde hazırlandı:

1. *Kalıp RNA Karışımı Hazırlanması:*

-Total RNA 10µl (100 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiş)

-Random primer 1µl (0.2µg/µl stok solüsyonundan)

Karıştırılarak, 70 °C'de 5 dakika inkübe edildi, hemen buz üzerine alındı.

2. *Reaksiyon Ana Karışımı Hazırlanması:*

-5x reaksiyon tamponu (250mM Tris-HCl (pH 8,3 at 25°C),

250mM KCl, 20mM MgCl₂, 50mM DTT.) 4µl

-Rnaz inhibitörü (20mM HEPES-NaOH (pH 7,5), 50mM NaCl,

8mM DTT, 0,5mM ELUGENT® Deterjanı ve 50% gliserol.) 1µl

-dNTP karışımı (10mM dATP, 10mM dTTP, 10mM dGTP, 10mM dCTP) 2µl

karıştırılarak 25 °C de 5 dk inkübe edildi.

3. *İlk İplik cDNA Sentezi:*

-Reaksiyon Ana Karışımı 9 µl

-Kalıp RNA karışımı 11 µl

-M-MuRT 1 µl (200 U/µl)

(1 ünite RevertAid™ M-MuLV RT, 37°C'deki DE-81 üzerine adsorbe edilmiş polinükleotit parçasına, 10 dakikada 1 mol dTMP ekleyen miktardır.)

karıştırıldı ve 25 °C de 10 dakika, 42 °C de 60 dk. ve 70 °C de 10 dk. inkübe edildi.

6.4.3. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi İşlemlerinin Kontrolü

Elde edilen cDNA'nın 2µl'si kalıp olarak kullanılarak bir *housekeeping* gen olan β-Aktin geni için PCR kuruldu. PCR sonrası yapılan elektroforezde β-Aktin gen amplifikasyon ürününün gözlenmemesi RNA izolasyonunun başarısız olduğu yönünde yorumlandı ve bu örnekler için izolasyon protokolü tekrarlandı.

PCR ve elektroforez koşulları aşağıda belirtilmiştir:

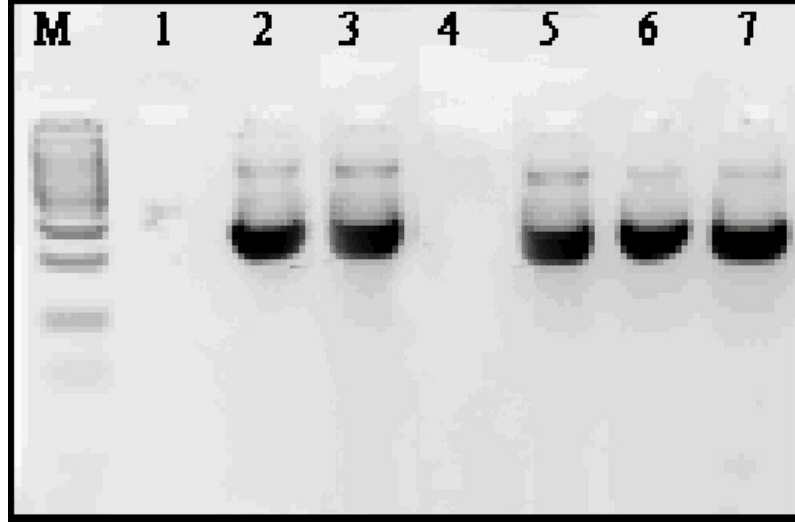
PCR karışımı:

		(son konsantrasyon)
- Taq polimeraz master mix, 2x	10 µl	1x (10nM KCl, 1,5mM MgCl ₂ , 20mM Tris-HCl(pH8.8), 10mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 mg/ml BSA, 0,2 mM dNTP karışımı, 1,25 U RBC Taq DNA polimeraz)
- İleri Primer, 5µM	1 µl	250 nM
- Geri Primer, 5µM	1 µl	250 nM
- Kalıp	2 µl	
- Su	ad 20 µl	

Termal Profil:

- 95°C'de 10 dk,
- 95°C'de 20 sn., 58°C'de 15 sn., 72°C'de 30 sn. (36 siklüs)
- 72°C'de 5 dk.

Elektroforez: %1,2'lik agaroz jel kullanılarak 1x LB (lityum borat) hızlı elektroforez tamponu ortamında 350 V / 30 cm elektrik alanda 10 dakika süre ile yapıldı. İlk ve son kuyulara DNA marker yüklenerek, yaklaşık 300 bp'ye karşılık gelen alanda bant varlığı incelendi (Şekil 21).



Şekil 21. Elde edilen RNA'ların kontrolü.

1. ve 4. hatlardaki örneklerden RNA izole edilemediğinden izolasyon protokü tekrarlandı.

6.4.4. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR

Elde edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak, BRCA1, BRCA2, P16, P15, P53, P73, GSTP1, TIMP3, CDH13, RASSF1, ATM, THBS1, PAX6, PAX5, PTEN, STK11, CASP8, CD44, ESR1, RARB, MGMT, MLH1, MSH6 genlerine ve 4 *housekeeping* gene (ACTB, B2M, RPL13A ve PUM1) özgün bölgeler, amplifikasyon durumunu ve miktarını gerçek zamanlı olarak görüntülemeye izin veren Stratagene Mx3000P cihazı kullanılarak çoğaltıldı. Her gen, bir çift primer ve bir adet hidroliz probu (UPL Universal Probe Library, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) kullanarak, ayrı reaksiyonlarda tek başına amplifiye edildi (Tablo 6).

Rölatif kantitasyon PCR analizleri de yine Stratagene Mx3000P cihazının kendi yazılımı ile (MxPro, Stratagene, Agilent Technologies Inc., Clara, CA, USA) gerçekleştirildi.

Tablo 6. PCR için Kullanılan Primer ve Prop Listesi

Gen	GenBank/EMBL no.	Primer 1 (<i>düz</i>)	Primer 2 (<i>ters</i>)	UPL Prop no.
ATM	ENSG00000149311	ccaggcaggaatcattcag	caatcctfttaaatagacggaagaa	53
BRCA1	ENSG0000012048	ttgtgatgtggaggagcaa	gattccaggtaagggttc	11
BRCA2	ENSG00000139618	agcttactccggccaaaa	ttctccaatgcttgtaaataa	50
CASP8	ENSG00000064012	agggtcaaattctgcctac	ggcactggctgtttgctt	29
CD44	ENSG00000026508	tgatcaggcattgatgatg	gtcaaaagcccgtggtgt	67
CDH13	ENSG00000140945	gcgtgtacactgctctctcc	aaagtcccagtgcccgtag	59
CDKN2A	ENSG00000147889	gtggacctggctgaggag	tcttcaatcggggatgctt	34
CDKN2B	ENSG00000147883	gcggggactagtggagaag	ctgccatcatcatgacct	17
ESR1	ENSG00000091831	ttactgaccaactggcaga	atcatggagggtcaaatcca	24
GSTP1	ENSG00000084207	gcaggagggctcactcaa	ggtctccgtctggaactt	24
MGMT	ENSG00000170430	caccgttgcgacttgta	ctccagcttcccaagg	47
MLH1	ENSG00000076242	aggagtcgacctctcagg	gtccactccaggagtgtg	36
MSH6	ENSG00000116062	ttaagaggctgaattggcagt	cactcttatctgttacgtaagtgtgc	21
PAX5	ENSG00000196092	acgctgacagggatggtg	cctccaggagctgtgtacg	83
PAX6	ENSG00000007372	ttcagagcccatattcgag	gagctgattcactccgctgt	20
PTEN	ENSG00000171862	ggggaagtaaggaccagagac	tccagatgattctttaacaggtagc	48
RARB	ENSG00000077092	cactgtcatcggaggactt	gctggtgctctgtgttcaat	16
RASSF1	ENSG00000068028	gctcgtctgcctggactg	ccactccacaggctcgtc	23
STK11	ENSG00000118046	ggaggccaactggaagaa	tgcttctctcgtgtataacacat	42
THBS1	ENSG00000137801	gccacagttcctgatggag	ccatggagaccagccatc	56
TIMP3	ENSG00000100234	ctgtgcaactcgtggagag	ggcaggtagtagcaggacttg	14
TP53	ENSG00000141510	ccccagccaaagaagaaac	aacatctcgaagcgtctac	58
TP73	ENSG00000078900	acgtttgagcactctgga	cgcccaccactcattatt	60
ACTB	NM_001101	ccaaccgcgagaagatga	ccagaggcgtacaggatag	64
B2M	NM_004048	taggagggtggcaacttag	cttatgcacgcttaactatcttaaaa	32
PUM1	NM_001020658	agtgggggactagcgttag	gtttcatcactgtctgcatcc	22
RPL13A	NM_012423	gaggcccctaccacttcc	aacacctgagacgggtccag	28

6.4.5. Primer Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Primerler için 100µM stok, 10µM çalışma solüsyonları hazırlandı. Her bir primer çifti için 100, 200, 400 nM final konsantrasyonlarının kombinasyonlarında reaksiyonlar kuruldu. Reaksiyon karışımı, *Hot start* polimeraz içeren real-time premiks (ThermOne, RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) ile toplam hacim 20 µl olacak şekilde hazırlandı:

		(son konsantrasyon)
Taqman premiks (RBC Bioscience), 2x	10 µl	1x
Düz primer, 10µM	1-4 µl	100-400nM
Ters primer, 10µM	1-4 µl	100-400nM
Prop, 10µM	0,2 µl	100nM
cDNA	2 µl	
su	ad 20 µl	

İki primerin bir arada çalışmasını optimize etmek için 9 kombinasyonda PCR kuruldu (Tablo 7). Dokuz farklı konsantrasyon karışımının her biri PCR plağına 18µl olacak şekilde pipetlendi. Üzerine 100 ng referans RNA'dan elde edilen cDNA pipetlendi. İki adet reaksiyon karışımına cDNA yerine eklenen su ile negatif kontrol (NTC) oluşturuldu (Tablo 8).

Tablo 7. Optimizasyon deneyinde 9 farklı primer konsantrasyonu

		Düz primer		
		100 nM	200 nM	400 nM
Ters Primer	100 nM	(K1) 100/100	(K2) 100/200	(K3) 100/400
	200 nM	(K4) 200/100	(K5) 200/200	(K6) 200/400
	400 nM	(K7) 400/100	(K8) 400/200	(K9) 400/400

Tablo 8. Dokuz farklı primer konsantrasyonu için reaksiyon karışımları

	1x	(6x)	1x	(6x)	1x	(6x)
	(K1) 100 / 100		(K2) 100 / 200		(K3) 100 / 400	
Realtime premiks (2x)	10	60	10	60	10	60
Düz primer	1	6	1	6	1	6
Ters primer	1	6	2	1,2	4	2,4
Prop (100 nM)	0,2	1,2	0,2	1,2	0,2	1,2
Su	5,8	34,8	4,8	28,8	2,8	16,8
Son Hacim (µl)	18	108	18	108	18	108
	(K4) 200 / 100		(K5) 200 / 200		(K6) 200 / 400	
Realtime premiks (2x)	10	60	10	60	10	60
Düz primer	2	1,2	2	1,2	2	1,2
Ters primer	1	6	2	1,2	4	2,4
Prob (100 nM)	0,2	1,2	0,2	1,2	0,2	1,2
Su	4,8	28,8	3,8	22,8	1,8	10,8
Son Hacim (µl)	18	108	18	108	18	108
	(K7) 400 / 100		(K8) 400 / 200		(K9) 400 / 400	
Realtime premiks (2x)	10	60	10	60	10	60
Düz primer	4	2,4	4	2,4	4	2,4
Ters primer	1	6	2	1,2	4	2,4
Prob (100 nM)	0,2	1,2	0,2	1,2	0,2	1,2
Su	2,8	16,8	1,8	10,8	-	-
Son Hacim (µl)	18	108	18	108	18	108

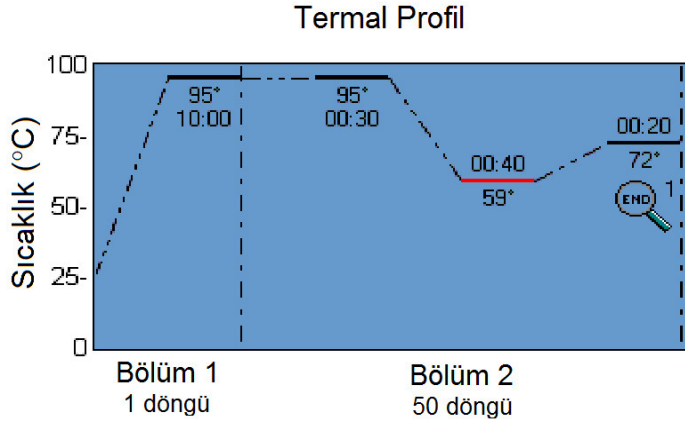
Her bir konsantrasyon 4'lü tekrarlarla çalışıldı. Ekspansiyel fazın en erken döngüde başladığı (en küçük Ct'ye sahip) kombinasyon tercih edildi.

6.4.6. Sıcaklık Profili (Termal Profil)

Hotstart Taq Polimeraz'ın aktivasyonu ve ilk denatürasyon için 95°C'de 10 dakika'nın ardından her biri 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 59°C'de 40 saniye *annealing* ve 72°C'de 20 saniye polimerizasyon basamağını içeren 50 döngü halinde amplifikasyon gerçekleştirildi. Floresan veriler *annealing* basamağının ardından elde edildi.

UPL prop/primer seti için önerilen *annealing* sıcaklığı 60°C olmasına rağmen, 59°C'de yapıldığında, PCR verimliliklerinin arttığı görüldü. Ayrıca, önerilen 40 döngülük bir PCR olmasına rağmen, bu çalışmadaki örneklerin bazılarının ilk kalıp cDNA miktarının çok düşük olması sebebiyle, Ct hesaplanabilmesi için PCR döngü sayısı 50'ye çıkarıldı.

Tüm genler için aynı termal profil kullanıldı (Şekil 22).



Şekil 22. PCR sıcaklık profili

6.4.7. Standart Eğri ve PCR Verimliliği

Hem primer ve prop optimizasyonu, hem de standart eğri çizimlerinde cDNA'ya dönüştürülen referans RNA (Universal Human Normal Tissue RNA, BioTaq, Gaithersburg, MA, USA) kullanıldı. Bu hesaplamalar için farklı insan dokularından elde edilen ve kantitatif olarak içerdiği RNA miktarı belirli olan bir insan referans RNA havuzu kullanılması tercih edildi.

Dört referans ve diğer 23 genin amplifikasyon verimliliklerini elde etmek üzere standart eğrilerini çizmek için gerçekleştirilen çalışmada, referans RNA'dan çevrilen cDNA örneğinin en az 4 farklı dilüsyonu kullanıldı. Varyasyonu azaltmak için referans RNA rastgele

(*random*) primerler kullanılarak tek oturumda cDNA'ya çevrildi ve genlerin tümünde tek seferde hazırlanan aynı dilüsyon serisi kullanıldı. Başlangıç konsantrasyonu 100 ng/μl olacak şekilde 100 kat seyreltildi. Tüm genler için kullanılmak üzere, her bir dilüsyon için bir cDNA havuzu oluşturuldu ve bu aşamadaki değişkenler kontrol altına alındı.

Her bir gen için, cDNA karışımı 5 seri dilüsyon noktasında ve (1 ng'dan 0,01 ng'a kadar) 3'lü tekrar ile (triplike) çalışılarak standart eğriler belirlendi.

6.4.7. Çalışma İçi Kontroller ve Çalışmalar Arası Varyasyon

Dört *housekeeping* ve diğer 23 genin real time kantitasyonları toplam 51 örneğe ait cDNA'da çift tekrarlar ile (duplike olarak) çalışıldı. Ayrıca, deneyin tümü çok sayıda plak ile tamamlandığından, qRT-PCR çalışma içi kesinliğinin doğruluk ve tekrarlanabilirliği belirlendi. Çalışma içi ve çalışmalar arası varyasyon her bir deneyde iki farklı konsantrasyonda (50ng ve 10 ng) konsantrasyonundaki referans cDNA'nın ikişer tekrarlı PUM1 geninin amplifikasyonu gerçekleştirildi. Çalışmalar sırasında kullanılan plak yerleşiminin örneği Şekil 23'de gösterildi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
PUM1	A	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	10 ng/μl
	B	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	10 ng/μl
RPL13A	C	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	1 ng/μl
	D	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	1 ng/μl
B2M	E	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	NTC
	F	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	NTC
ACTB	G	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	
	H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
PUM1	A	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	10 ng/μl
	B	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	10 ng/μl
BRCA1	C	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	1 ng/μl
	D	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	1 ng/μl
B2M	E	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	S33	NTC
	F	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	S33	NTC
ACTB	G	S34	S35	S36	S37	S38	S39	S40	S41	S42	S43	S44	
	H	S34	S35	S36	S37	S38	S39	S40	S41	S42	S43	S44	

Şekil 23. Deney sırasında örneklerin plak üzerindeki yerleşim örnekleri
A. Standart eğri oluştururken, B. Her bir genin çalışma düzeni.

Varyasyonlar ham Ct değerleri üzerinden değerlendirildi. Plak içi ve plaklar arasında kontrol örnekleri arasındaki Ct farkı "Sapma Katsayısı Yüzdesi (%CV)" 0.05'ten büyük olan çalışmalar ile duplike değerler arasında 2.0 Ct değerinden büyük fark olan örnekler dikkate alınmadı ve tekrarlandı (Bkz. Bölüm 6.2.).

6.4.8. Normalizasyon

6.4.8.1. Referans Genlerin Belirlenmesi

Çalışılan örnekler arasında, test edilen referans genler içinde en uygun referans genin araştırılması *Excel* tabanlı program olan *NormFinder* ile gerçekleştirildi [371].

6.4.8.2. Rölatif Gen kantitasyonu

Amplifikasyon eğrilerinden elde edilen ham değerler, önce duplike karşılıklarıyla geometrik ortası alınarak yahut duplikasyonlardan biri değerlendirme dışı bırakılmak kaydıyla Ct olarak hesaplandı. Genorm yazılımı kullanılarak housekeeping genler değerlendirildi, hesaplanan housekeeping gen averajı, $\Delta\Delta Ct$ formülüyle normalizasyon için kullanıldı.

Her bir gen için örnekler arasındaki en düşük Ct belirlendi. ΔCt yöntemi kullanılarak en düşük Ct değerine sahip örneğe kıyaslanan ekspresyon verisi elde edildi. Bu veri normalize edilmiş değere ulaşmak için normalizasyon faktörüne bölündü. Normalize değerleri 1'den küçük olanlar, kavrama kolaylığı açısından geometrik tersi alınarak gösterildi ve azalmış ekspresyonu belirtmek üzere değeri negatif olarak yazıldı.

6.4.9. Kantitatif Ekspresyon Skorlarının Kategorizasyonu

Kantitatif olmayan metilasyon durumlarının ekspresyon ile ilişkisini değerlendirme aşamasında kantitatif olmayan ekspresyon değerleri kullanıldı. Burada normalize skorlar, “azalmış ekspresyon”, “artmış ekspresyon” ve “değişiklik yok” olmak üzere 3 kategoriye ayrıldı. Bu kategoriler yapılırken eşik değeri olarak normalize değerlerde $p < 0.05$ olan $\pm 1,5$ kat kullanıldı [419-421].

6.4.10. Normalize Sonuçların Görselleştirilmesi

Normalize edilmiş ekspresyon değerleri kavrama kolaylığı sağlaması açısından ısı haritası (*heatmap*) olarak gösterildi. *Heatmap* hazırlanırken, ortalamadan sapma değerlerinin logaritması kullanıldı. Artmış ekspresyonlar yeşil, azalmış ekspresyonlar kırmızı ile gösterildi.

6.5. Gen Promotor Bölgeleri Metilasyon Durumlarının Belirlenmesi

İncelenen 23 gen bölgesine ait promotor bölgelerin metile olup olmadığının belirlenmesi için, DNA izolasyonunun ardından, metilasyon MLPA yöntemi kullanıldı.

6.5.1. DNA İzolasyonu

İzolasyonlar, silika membran/kolon teknolojisi kullanılarak çoklu gruplar halinde gerçekleştirilmiş olup, porsiyonize halde -85 C de saklanmaktaydı. MLPA çalışması için DNA miktarı ve saflığı çok önemli olduğundan, her bir örneğin spektrofotometre ile (Nanodrop 1000 UV/Vis, Thermo Scientific Inc., Barrington, IL, USA) 260 nm ve 280 nm’de Absorbans ölçümleri yapılarak saflık ve konsantrasyonları hesaplandı. Son DNA konsantrasyonu 20 ng/µl olacak şekilde MLPA için kullanılmak üzere seyreltilti.

6.5.2. Metilasyon MLPA

Çalışmanın ikinci ayağı olan tümör supresör genlerin promoter bölge CpG adalarının metilasyon değişikliklerinin saptanması, spesifik ve sensitif bir yöntem olan metilasyona spesifik MLPA ile gerçekleştirildi. MRC-Holland (Amsterdam, Hollanda) firmasının ticari halde sunduğu bazı tümör supresör genleri ve bazı genlerde metilasyon durumunu incelemeye yönelik iki farklı kit ile kurulan reaksiyonlardan, ME001 kodlu birinci kit ile TP73, CASP8, VHL, RARB, MLH1, CTNNB1, RASSF1, FHIT, CASR, APC, ESR1, PARK2, CDK6, CDKN2A(P14-ARF:P16), CDKN2B, DAPK1, AI651963, CREM, PTEN, CD44, GSTP1, ATM, IGSF4, TNFRSF1A, TNFRSF7, CDKN1B, PAH, CHFR, BRCA2, MLH3, TSC2, CDH1, CDH13, HIC1, BRCA1, BCL2, KLK3, TIMP3; ME002 kodlu ikinci kit ile ise CREM, BRCA1, BRCA2, PARK2, ATM, TP53, PTCH, PTEN, MGMT, MLH3, PAX5, CDH13, PAH, TP73, WT1, PMP22, VHL, GSTP1, TSC2, CHFR, ESR1, TNXB, RB1, MSH6, APC, THBS1, IGSF4, PTEN, STK11, MGMT, PARK2, PYCARD, PAX6, ATM, CDKN2A, GATA5, IL2, RARB, CD44, RB1, CASR gen bölgeleri incelendi. Kit kapsamında; CTNNB1, CASR, PARK2, CDK6, PTCH, PMP22, TNXB, ASC, IL2, CREM, TNFRSF1A, TNFRSF7, PAH, AI651963, MLH3, TSC2, CDH1, BCL2, KLK3 genlerdeki incelemeler metilasyon durumu ile ilgili bilgi vermezken, TP73, CASP8, VHL, RARB, MLH1, RASSF1, FHIT, APC, ESR1, CDKN2A(P14-ARF:p16), CDKN2B, DAPK1,

ATM, IGSF4, CDKN1B, CDH13, HIC1, BRCA1, TIMP3, BRCA2, TP53, PTEN, PAX5, CDH13, WT1, GSTP1, CHFR, ESR1, MSH6, THBS1, IGSF4, STK11, MGMT, PYCARD, PAX6, GATA5, CD44, RB1 genlerde metilasyon durumlarını değerlendirmeye imkan tanımaktadır.

ME001 kodlu birinci kit ile 26 hedef ve 15 referans olmak üzere 41 gen bölgesi eş zamanlı olarak amplifiye edilmektedir:

Hedef Bölgeler:

1. TIMP3 (*Tissue inhibitor of metalloproteinases 3*)
2. APC (*Adenomatous polyposis coli*)
3. CDKN2A (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/ p16*)
4. MLH1 (*MutL homolog 1*)
5. ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*)
6. RARB (*Retinoic acid receptor beta*)
7. CDKN2B (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B/ p15*)
8. HIC1 (*Hypermethylated in cancer 1*)
9. CHFR (*Checkpoint with fork-head associated and ring finger*)
10. BRCA1 (*Breast carcinoma 1*)
11. CASP8 (*Caspase 8*)
12. CDKN1B (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B/ p27^{KIP1}*)
13. PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*)
14. BRCA2 (*Breast carcinoma 2*)
15. CD44 (*Cluster of differentiation 44*)
16. RASSF1 (*Ras association domain-containing protein 1*)
17. DAPK1 (*Death-associated protein kinase 1*)
18. VHL (*Von Hippel–Lindau tumor suppressor*)
19. ESR1 (*Estrogen receptor 1*)
20. RASSF1 (*Ras association domain-containing protein 1*)
21. TP73 (*Tumor protein 73*)
22. FHIT (*Fragile histidine triad protein*)
23. IGSF4 (*Immunoglobulin superfamily, member 4*)

24. CDH13 (*Cadherin 13*)
25. GSTP1 (*Glutathione S-transferase P*)
26. MLH3 (*MutL homolog 3*)

Referans bölgeler:

1. CREM (Referans)
2. PARK2 (Referans)
3. TNFRSF1A (Referans)
4. MLH3 (Referans)
5. PAH (Referans)
6. BCL2 (Referans)
7. TSC2 (Referans)
8. CDK6 (Referans)
9. CDH1 (Referans)
10. AI651963 (Referans)
11. KLK3 (Referans)
12. BRCA2 (Referans)
13. TNFRSF7 (Referans)
14. CTNNB1 (Referans)
15. CASR (Referans)

ME002 kodlu ikinci kit ile 27 hedef ve 14 referans olmak üzere 41 gen bölgesi eş zamanlı olarak amplifiye edilmekteydi:

Hedef Bölgeler:

1. BRCA1 (*Breast carcinoma 1*)
2. BRCA2 (*Breast carcinoma 2*)
3. ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*)
4. TP73 (*Tumor protein 53*)
5. PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*)
6. MGMT (*Methyl guanine DNA methyl transferase*)

7. PAX5 (*Paired box gene 5*)
8. CDH13 (*Cadherin 13*)
9. TP73 (*Tumor protein 73*)
10. WT1 (*Wilms' tumor suppressor*)
11. VHL (*Von Hippel–Lindau tumor suppressor*)
12. GSTP1 (*Glutathione S-transferase P*)
13. CHFR (*Checkpoint with fork-head associated and ring finger*)
14. ESR1 (*Estrogen receptor 1*)
15. RB1 (*Retinoblastoma protein 1*)
16. MSH6 (*MutS Homolog 6*)
17. THBS1 (*Thrombospondin 1*)
18. IGSF4 (*Immunoglobulin superfamily, member 4*)
19. STK11 (*Serine/threonine kinase 11*)
20. MGMT (*Methyl guanine DNA methyl transferase*)
21. PYCARD (*PYD(PYRIN-PAAD-DAPIN) and CARD(C-terminal caspase-recruitment domain) domain containing*)
22. PAX6 (*Paired box gene 6*)
23. CDKN2A (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/ p16*)
24. GATA5 (*GATA binding 5*)
25. RARB (*Retinoic acid receptor beta*)
26. CD44 (*Cluster of differentiation 44*)
27. RB1 (*Retinoblastoma protein 1*)

Referans bölgeler:

1. CREM (Referans)
2. PARK2 (Referans)
3. PTCH (Referans)
4. MLH3 (Referans)
5. PAH (Referans)
6. PMP22 (Referans)
7. TSC2 (Referans)

8. TNXB (Referans)
9. APC (Referans)
10. PTEN (Referans)
11. PARK2 (Referans)
12. ATM (Referans)
13. IL2 (Referans)
14. CASR (Referans)

Hem ME001 hem de ME002 için aynı MLPA protokolü kullanıldı:

1. Denatürasyon:

Reaksiyon, 100 ng DNA ile kuruldu.

DNA Seyreltme:

- 100 ng DNA, 0.2 ml kapaklı mikrotüp içerisinde TE tamponu kullanarak 5µl hacme tamamlandı.

Ardından, 98 °C'de 45 dakika inkübe edildi ve inkübasyon sonunda 60 °C'ye soğutularak sıcak bloktan alındı.

2. Hibridizasyon:

Prop Karışımı:

-Prop Karışımı (Siyah kapaklı tüp, MLPA Kit) 1,5µl

-MLPA Tamponu (Sarı kapaklı tüp, MLPA Kit) 1,5µl

kariştirilerek denatürasyondan alınan tüpe eklendi. Ardından, 98 °C'de 1 dakika denatürasyon, sonrasında da 60 °C'de 18 saat hibridizasyon için inkübe edildi.

3. Ligasyon ve Enzim Kesimi:

Ligasyon için ve Ligasyon+Enzim Kesimi için olmak üzere iki ayrı karışım hazırlandı.

Ligasyon 65 Karışımı:

-Ligaz 65 Tampon B (Beyaz kapaklı tüp) 1,5µl

-Ligaz 65 Enzim (Yeşil kapaklı tüp)	0,25µl
-su	ad 10µl
Ligasyon ve Kesim Karışımı:	
-Ligaz 65 Tampon B (Beyaz kapaklı tüp)	1,5µl
-Ligaz 65 Enzim (Yeşil kapaklı tüp)	0,25µl
-Hha I Restriksiyon Enzimi (ER1851, Fermentas, Thermofisher Scientific Inc., Barrington, IL, USA,)	1µl
-su	ad 10µl
Ligaz A tamponu hazırlandı.	
-Ligaz A tamponu	3µl
-su	10µl

İnkübasyondan çıkan DNA üzerine seyreltilmiş Ligaz A tamponu eklenerek, karıştırıldı. Yeni karışım 10µl+10µl olmak üzere iki ayrı tüpe alındı. Birinci tüpe Ligasyon 65 karışımı, ikinci tüpe ise Ligasyon ve Kesim karışımı eklendi. Önce 49 °C’de 30 dk inkübe edildi, ardından ise 98 °C’de 10 dk enzim denatüre edildi.

4. SALSALSA PCR:

SALSALSA PCR karışımı hazırlandı.

-SALSALSA PCR Primer	1µl
-Enzim seyreltme tamponu	1µl
-DNA polimeraz	0,25µl
-PCR tamponu	2µl
-su	ad 20µl

Hem Ligasyon hem de Ligasyon+Kesim işlemi tamamlanan tüpler için (her örnek için iki farklı reaksiyon olmak üzere) PCR kuruldu:

-SALSA PCR karışımı	20µl
-DNA karışımı	5µl

PCR reaksiyonu için termal profil şu şekildeydi:

- 95 °C'de 1 dk,
- 95 °C'de 30 sn, 60 °C'de 30 sn, 72 °C'de 60 sn (36 siklüs),
- 72 °C'de 20 dk.

Uzun süreli inkübasyon ve PCR basamakları sırasında tüplerdeki reaksiyon karışımlarının buharlaşarak kaybolmasını engellemek için kapağın açılmasını gerektiren her basamak sonrasında işlemlere yeni tüp/kapak ile devam edildi.

6.5.3. SALSA PCR Etkinliğinin PAGE ile Kontrolü

Toplamda iki gün süren MLPA-SALSA PCR reaksiyonunun ardından amplifiye olan propları görüntülemek için kapiller elektroforez sistemi kullanılması gerekmektedir. Ancak kapiller elektroforez cihazının 8 örneği eş zamanlı olarak koşturulması ve sarf malzemelerinin nispeten pahalı olması sebebi ile MLPA optimizasyonları sırasında maliyetleri düşürmek için daha ucuz bir yöntem olan Poli-Akrilamit Jel Elektroforezi (PAGE) ile bantlar gözlemlendikten sonra kapiller elektroforez sistemine yüklendi.

PAGE için kullanılan protokol aşağıda belirtilmiştir:

%8'lik Jelin hazırlanması:

-Akrilamit/bisakrilamit (39:1, %40 w/v)	3 ml
-TBE Tamponu (10x)	1,5 ml
-TEMED	15 µl
-Amonyum per sülfat	150 µl
-Su	ad 15 ml

Elektroforez koşulları şu şekildeydi:

Her kuyuya 2 µl yükleme boyası içinde, 10 µl MLPA-PCR ürünü yüklendi. Son kuyuya ise 100 bp DNA *marker* eklendi (RBC Biosciences, Taipei, Taiwan). 150 V/ 8 cm elektriksel alanda 35 dakika koşturuldu.

6.5.4. PCR Ürünlerinin Ayrımı

PCR reaksiyonu sonrası elde edilen ürünlerin separasyonu, 8 adet 33 cm kapiller içeren, Beckman Coulter CEQ 8000 kapiller elektroforez sisteminde yapıldı.

Örnekler cihaza yüklenirken şu şekilde hazırlandı:

-PCR ürünü	1 µl
-Size marker 60-600	0.5 µl
-SLS (deiyonize formamit içeren örnek yükleme tamponu)	36 µl

Elektroforez parametreleri ise şu şekildeydi (Şekil 24):

- Kapiller sıcaklığı: 50 °C.
- Denatürasyon: 90 °C'de 120 saniye.
- Enjeksiyon süresi: 2,0 KV ta 40 saniye.
- Elektroforez koşturma süresi: 4,0 KV'ta 80 dakika. (4,0 KV ayırtırmada çok iyi çözünürlük sağlanamayan bazı örneklerin elektroforezi 3,5 KV'ta tekrarlandı.)

Method:	Consumables:
Method Name: Frag-MLPA	Capillary Array Serial Number: 0301090234
Capillary Temperature: 50,0 °C	Capillary Array Part Number: 608087
Wait for Temperature: Yes	Total Length of Capillary: 33,00 cm
Denature Temperature: 90,0 °C	Length of Capillary to Detector: 30,00 cm
Denature Duration: 120 sec	Internal Diameter of Capillary: 75,00 µm
Pause Duration: 1 sec	Number of Runs: 70
Inject Voltage: 2,0 kV	Days on Instrument: 1,1 days
Inject Duration: 40 sec	
Separate:	GelPartNumber: 608010
Stage 1 Primary Voltage: 4,0 kV	Gel Lot Number: S906002-yalin
Stage 1 Ramp Duration: 2,0 min	Hours on Instrument: 17,00 hours
Stage 2 Separation Voltage: 4,0 kV	Buffer Part Number: 608012
Stage 2 Start Time: 10,0 min	Buffer Lot Number: CEQ Sequencing Separation Buffer
Stage 2 Ramp Duration: 5,0 min	
Total Separation Duration: 80,0 min	

Şekil 24. Elektroferez parametreleri

5'-Cy-5 işaretli PCR ürünlerinin elektroferez sonunda verdiği ışımaya cihaz tarafından 707 nm dalga boyu bantına denk gelen kanaldan ölçüldü. Cihaz elektroferogramında *size marker* kırmızı, PCR ürünleri ise mavi olarak gösterilmektedir.

6.5.5. Fragman Analizi

Kapiller Elektroferez sistemi tarafından saptanan floresan ham veriler, cihaz üreticisi tarafından sağlanan ve kendine has algoritmayı kullanan "Fragments" yazılımı (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) ile analiz edildi. Ham veriler anlamlı hale gelebilmesi için önce büyüklük standardı ile sonra cihaz fragman büyüklüğü kalibrasyon standardı ile normalize edilmesinin ardından eşik pik eğimleri ve yükseklikleri ile filtrelenerek fragman büyüklükleri belirlendi.

Fragman analizi için aşağıdaki parametreler kullanıldı (Şekil 25):

-Size Standart: 600 (60-600 tüm fragmanlar)

- Standart Eğri Modeli: Local Southern
- Mobilite/Süre: Mobilite
- Eğim Eşiği: %9
- Pik Eşiği: %3
- Güven Aralığı: %95
- Boya Mobilite Kalibrasyonu: AE Ver. 1.

Analysis Parameter Set: MLPA

Dye Mobility Calibration: AE ver.1

Std. Mobility Reference: None

Slope Threshold: 9

Include Peaks: 3 %

Identity STR Allele: No

SNP Analysis: No

Confidence Level: 95 %

Dye Spectra: Use calculated dye spectra

Std. Fragments Used:

60
70
80
90
100
120
140
160
180
190
200
220
240
260
280
300
320
340
360

Size Standard: SizeStandard-600

Dye Used: D 1

Size std. fit coefficient: .57

Model Used: Local Southern

Time/Mobility: Mobility

Şekil 25. Fragman analizi parametreleri

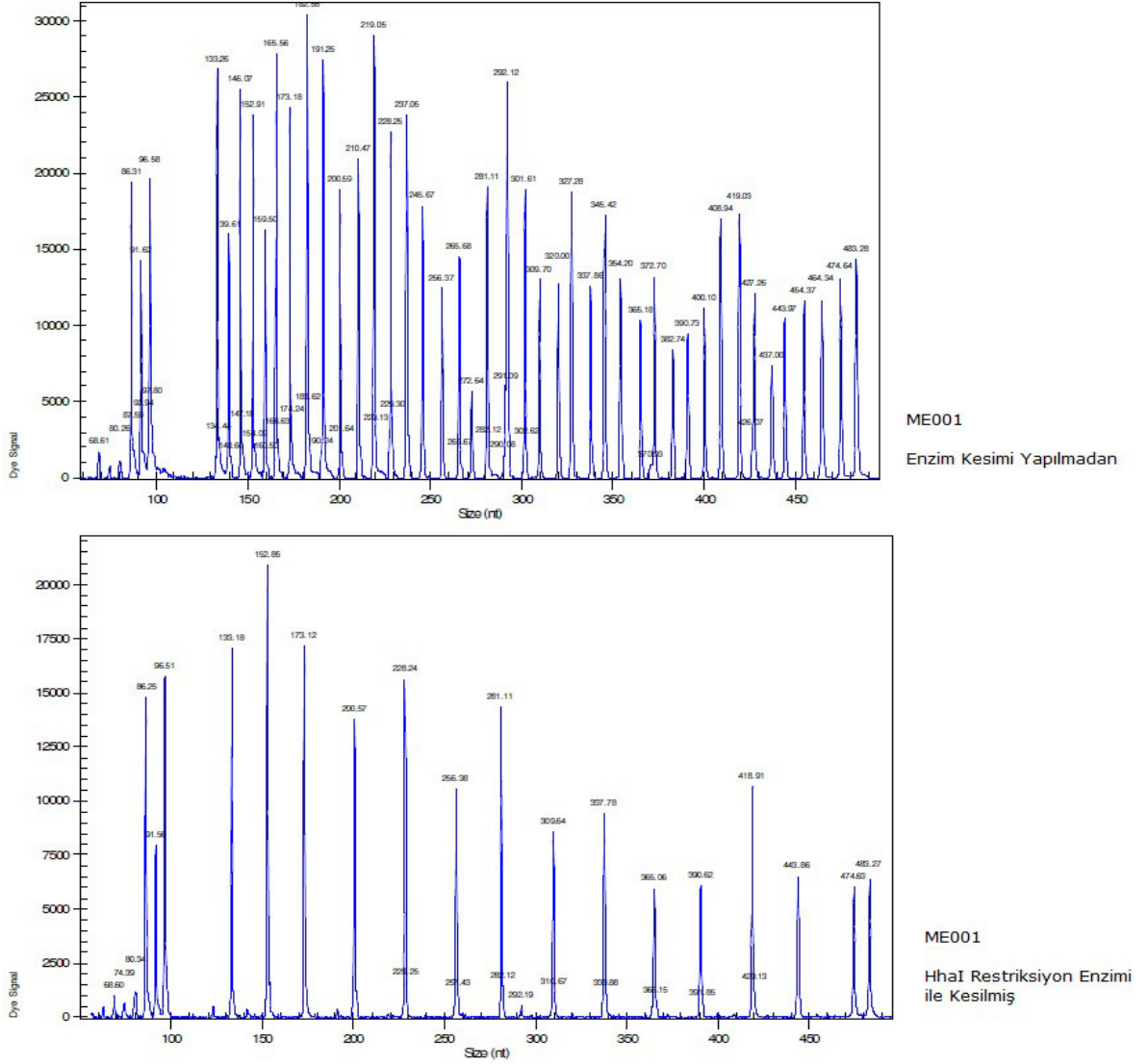
Büyükölük standardizasyonu için bu çalışmada olduğu gibi 60-500 baz arası geniş bir alana dağılmış fragmanların değerlendirilmesi için ideal olan “Local Southern” algoritması kullanıldı.

Fragman analizinin otomatik tamamlanmasının ardından hariçte bırakılan bazı bantların dahil edilmesi, işaretlenen bazılarının ise hariçte bırakılması şeklinde manüel olarak düzenlemeler yapıldı. Bu düzenlemeler yapılırken MLPA kitinin kullanıcı kitapçığında belirtilen ve gözlenmesi beklenen bant büyüklükleri dikkate alındı (Tablo 9).

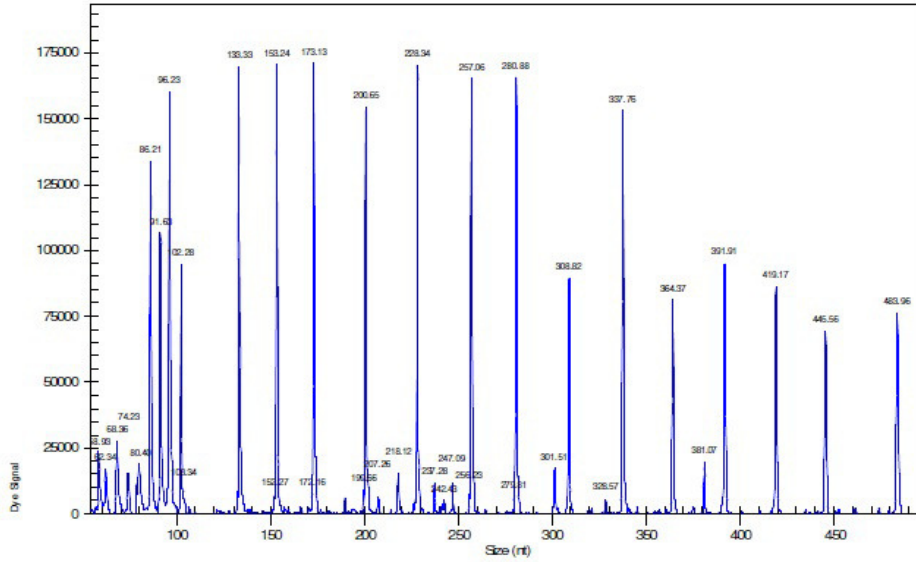
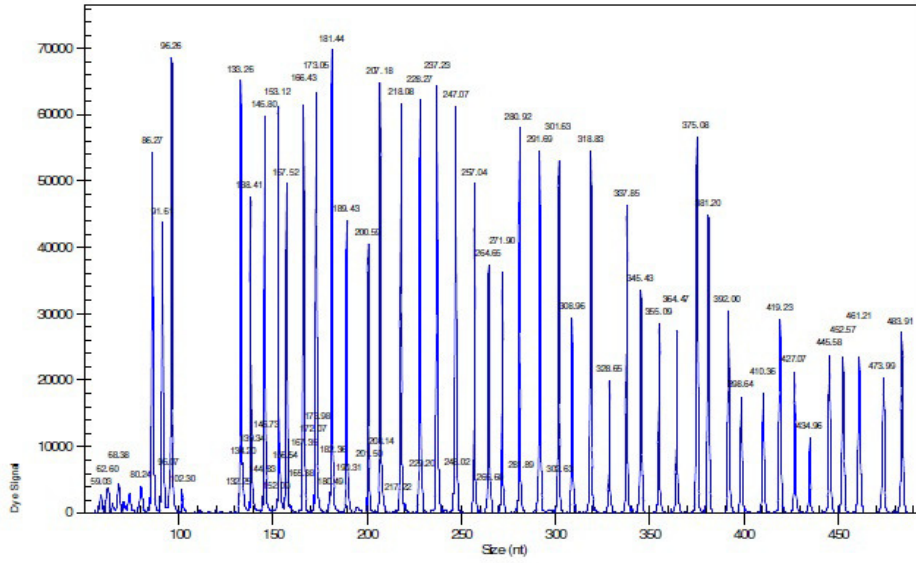
Tablo 9. ME001 ve ME002 kitleri için gözlenmesi beklenen prop büyüklükleri

ME001		ME002	
Fragman ismi	Baz büyüklüğü	Fragman ismi	Baz büyüklüğü
Q-Fragmanı 1	64	Q-Fragmanı 1	64
Q-Fragmanı 2	70	Q-Fragmanı 2	70
Q-Fragmanı 3	76	Q-Fragmanı 3	76
Q-Fragmanı 4	82	Q-Fragmanı 4	82
D-Fragmanı 1	88	D-Fragmanı 1	88
D-Fragmanı 2	92	D-Fragmanı 2	92
D-Fragmanı 3	96	D-Fragmanı 3	96
CREM	136	CREM	136
TIMP3	142	BRCA1	142
APC	148	BRCA2	148
PARK2	154	PARK2	154
CDKN2A	160	ATM	160
MLH1	166	TP53	166
TNFRSF1A	175	PTCH	175
ATM	184	PTEN	184
RARB	193	MGMT	193
MLH3	202	MLH3	202
CDKN2B	211	PAX5a	211
HIC1	220	CDH13	220
PAH	229	PAH	229
CHFR	238	TP73	238
BRCA1	247	WT1	247
BCL2	256	PMP22	256
CASP8	265	VHL	265
CDKN1B	274	GSTP1	274
TSC2	283	TSC2	283
PTEN	292	CHFR	292
BRCA2	301	ESR1	301
CDK6	310	TNXB	310
CD44	319	RB1	319
RASSF1	328	MSH6	328
CDH1	337	APC	337
DAPK1	346	THBS1	346
VHL	355	IGSF4	355
AI651963	364	PTEN	364
ESR1	373	STK11	373
RASSF1	382	MGMT	382
KLK3	391	PARK2	391
TP73	400	PYCARD	400
FHIT	409	PAX6	409
BRCA2	418	ATM	418
IGSF4	427	CDKN2A	427
CDH13	436	GATA5	436
TNFRSF7	445	IL2	445
GSTP1	454	RARB	454
MLH1	464	CD44	463
CTNNB1	472	RB1	472
CASR	481	CASR	481

Otomatik Fragman analizi ve takibindeki manüel düzenleme sonrasında fragman isimleri etiketlendi. Cihaz tarafından belirlenen fragman büyüklüğü değerlerinden beklenen değerden ± 3 baz aralığında gözlenenler, beklenen fragman olarak kabul edildi (Şekil 26 ve 27).



Şekil 26. ME001 testi için MLPA sonrası fragman analizi yöntemi

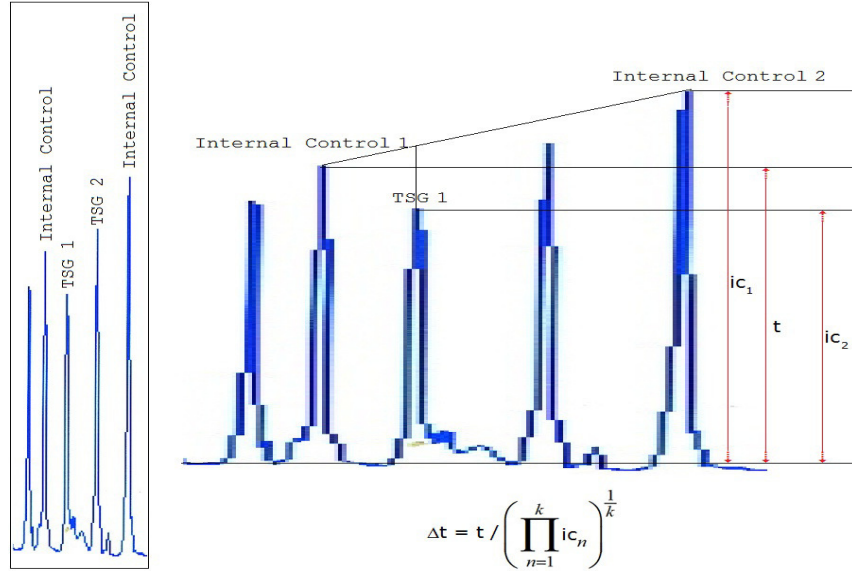


Şekil 27. ME002 testi için MLPA sonrası fragman analizi yöntemi

6.5.6. MLPA Normalizasyonu ve Metile Piklerin Değerlendirilmesi

Hem hasta hem de sağlıklı normal kontrollerin fragman analizi sonuçları, ölçülen floresan pik büyüklüklerine göre değerlendirildi. Floresan pik büyüklükleri karşılaştırılırken, eğri altında kalan alanlar değerlendirilmeye alındı. Hedef genlerin pik büyüklükleri, PCR ürünü boyu açısından sıralandığında bir altındaki ve bir üstündeki referansın pik alanları ve

toplam referans pik alanları ile aşağıda açıklanan algoritma kullanılarak normalize edildi (Şekil 28).



Şekil 28. Metilasyon miktarını belirlemede kullanılan pik normalizasyonu algoritması

Her bir hedef genin pik büyüklüğü, her bir deneydeki reaksiyonlar arası varyasyonu telafi etmek için, o reaksiyona ait referans genlerin geometrik ortalamasına ve büyüklük sırasına göre bir öncesindeki ve bir sonrasındaki referans genin geometrik ortalamasına oranlandı. Aynı örneğe ait enzim kesimi öncesi ve sonrası sonuçlar kıyaslanırken ve tüm örneklerin sonuçları değerlendirilirken, anlatıldığı şekilde oranlanarak normalize edilmiş büyüklükler (Δt) kullanıldı [422].

Enzim kesimi sonrası gözlenmemesi beklenen piklerin büyüklükleri (Δt_f), enzim kesimi öncesine (Δt_i) göre yüzdelikli oran olarak ifade edildi (Δt_m). Delta tm değerinin 0 ile 100 arası bir değer olması, metilasyon olmayan bölgeler için bu değer 0 olması, tüm hücrelerde hipermetilasyon gözlenen bölgelerde ise 100 olması beklenmekteydi [422].

$$\Delta t_m = \frac{\Delta t_i}{\Delta t_f} \%100$$

Hesaplamalar sonrasında Δt_m alt ve üst limitleri aşan değerler (sırasıyla sıfırın altı ve 100'ün üstü), alt ve üst limitlere eşit (sırasıyla 0 ve 100) olarak kabul edildi. Bu işlem sonucu bulunan sayı, “Beta Skoru” olarak isimlendirilmektedir [423].

$$\text{Beta} = \frac{\max(\Delta t_m, 0) + \min(\Delta t_m, 100)}{2}$$

Beta değerinin sıfıra yakın olduğu durumlarda, gerçek pik ile fon gürültüsünü ayırabilmek için bir eşik değeri kabul etmek gerekliydi. Beta değeri %25'in altında olan pikler gürültü olarak değerlendirildi. Kantitatif değerler, yarı kantitatif değerlere çevirelerek beta skorunun %25-%50 arası değerleri “hafif hipermetilasyon”, %50-75 arası değerleri “orta şiddette hipermetilasyon” ve %75'ten büyük değerleri ise “şiddetli hipermetilasyon” varlığı olarak kabul edildi [424]. Salt kalitatif olarak ise %0-%25 arası için “metilasyon yok”, %26-%100 arası için ise “metilasyon var” olarak değerlendirildi [425]. İstatistik hesaplamalarda hem sürekli hem de kategorize skorları kullanıldı.

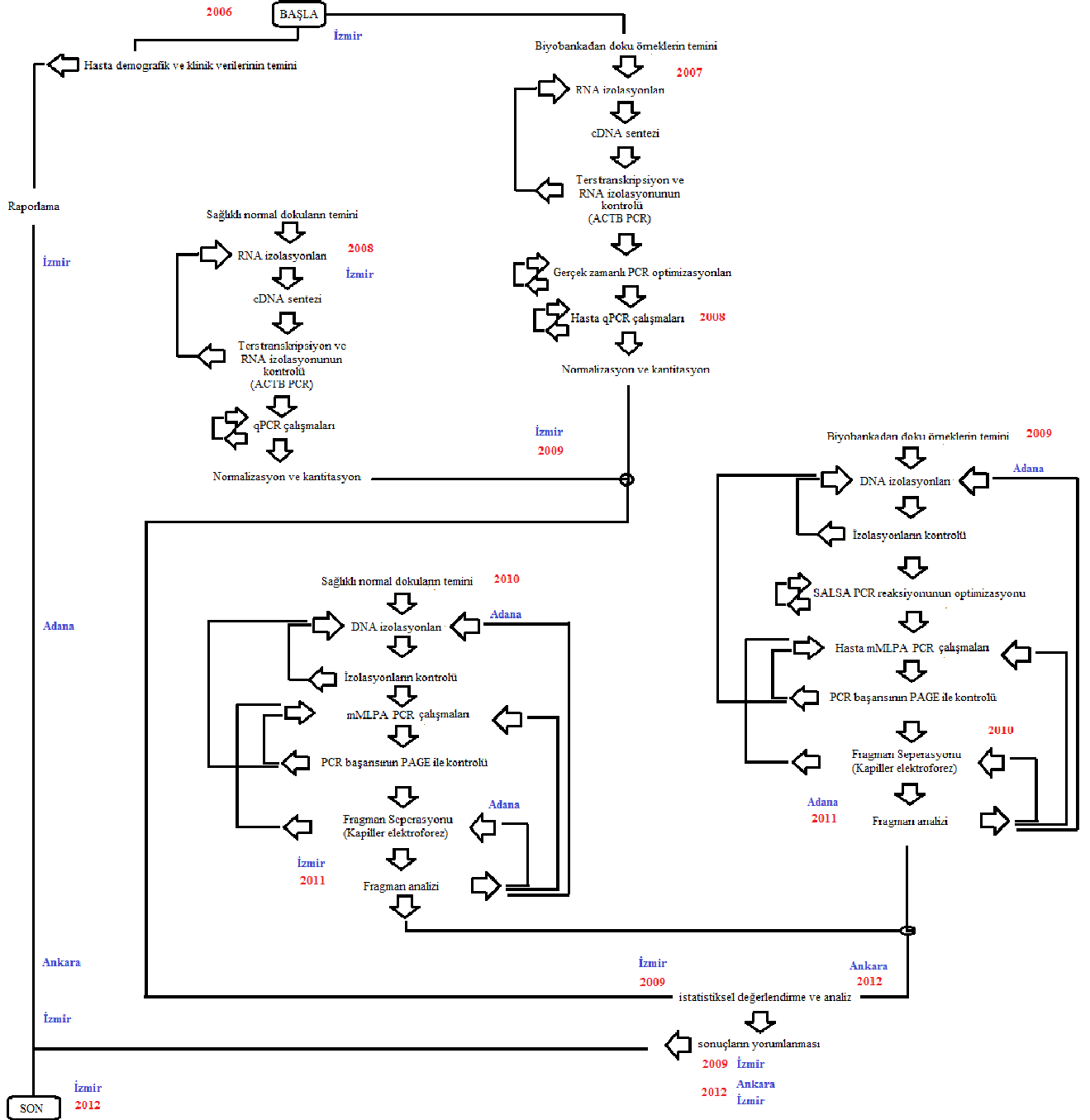
ME001 ve ME002 kitleri ile ayrı ayrı çalışılan gen grupları, sonuçlar analiz edilirken birlikte düşünüldü. Aynı genin farklı bölgelerine ait bölgeler a, b (aynı test içerisinde çalışılanlar) ve 1, 2 (farklı testlerle çalışılanlar) şeklinde isimlendirildi ve ayrı genlermiş gibi değerlendirilmeye alındı.

6.5.7. Normalize Sonuçların Görselleştirilmesi

Enzim kesimi sonrasında, enzim kesimi öncesine göre pik alanındaki yüzdesel değişme miktarını (Beta Skoru) ve Bölüm 4.5'te anlatıldığı üzere kategorize edilmiş beta skorunu görselleştirmek için ısı haritaları (*heatmap*) hazırlandı. Isı haritasında siyah gözüken bölgeler hiç metilasyon olmadığına (%0 (sıfır)), en parlak kırmızı renk ile ifade edilen bölgeler ise o bölgenin tamamen metile olduğuna (%100(yüz)) işaret etmektedir. Kırmızının diğer tonları ile gösterilen bölgelerin ise parlaklıkları, metilasyon miktarı (%1-%99) ile orantılıdır. Yarı kantitatif ısı haritasında da benzer şekilde metilasyon gözlenmeyen bölgeler siyah renk ile gösterilirken, kırmızı rengin üç tonu da koyudan parlağa doğru, sırasıyla, hafif, orta şiddette ve şiddetli hipermetilasyon durumlarına karşılık gelmektedir.

7. ARAŞTIRMA PLANI VE TAKVİMİ

Bu çalışma 2006-2012 yılları arasında yapılmıştır.



8. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İstatistiksel değerlendirme için veriler 3 kategoriye ayrıldı: Demografik veriler, işlenmiş RT-PCR verileri ve işlenmiş MLPA verileri. Yirmi sekiz örneğe ait verilerin analizindeki temel amaç, RT-PCR ve MLPA verilerini kullanarak demografik verilerdeki grupların istatistiksel olarak anlamlı farklara sahip olup olmadıklarının araştırılmasıydı. Ayrıca metilasyon skorları ile RT-PCR sonuçları arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığı incelendi.

8.1. Demografik Verilerin Kategorizasyonu

Seçilen örneklere ait verilerle gerçekleştirilecek analizlerde aşağıda listelenen demografik/kategorik özelliklerin tahmin edilip edilemeyeceği araştırıldı:

- a. Üreme durumu ile ilgili bilgiler: Menapoz durumu, Menarş yaşı, Gebelik Sayısı
- b. Aile Hikayesi: Ailede Kanser Hikayesi, Ailede Meme Kanseri Hikayesi
- c. Patolojik Tanımlayıcı ve Prognostik Faktörler: Histolojik Tip, Evre, Nükleer Grade, Mitotik Aktivite, T Grubu, Lenf Nodu invazyonu, Uzak Metastaz, Östrojen Reseptörü, HER2 Reseptörü

Kategorik özellikte olmayan veriler, nispeten az örnek sayısı sebebiyle sürekli halde istatistiksel olarak normal dağılım göstermeyeceğinden; tüm demografik veriler, kategorik hale dönüştürüldü. Bu kategorizasyon yapılırken, toplum ortalamasından ± 1 standart sapma (σ) dağılımında olanlar 2, -1σ altında olanlar 1 ve 1σ üzerinde olanlar 3 olarak skorlandırıldı [426,427]. Böylece menarş yaşı 11 ve altı olanlar 1, 12-14 arası olanlar 2, 15 ve üstü olanlar ise 3 skoruna sahip oldu [426]. Benzer şekilde, gebelik sayısı 0 ve 1 olanlar 1, 2-6 olanlar 2; 7 ve üzeri olanlar ise 3 olarak skorlandırılarak ilgili kategorik gruplara dahil edilmiş oldu [427].

8.2. Deneysel Varyasyonların Belirlenmesi

İnternal kontroller ile normalizasyon sırasında çalışma (bir 96'lı qPCR plağı) içi ve

çalışmalar arası varyasyonu belirleyebilmek için “Kruskal-Wallis” testi uygulandı ve Ct değerleri arasında Sapma Katsayısı Yüzdesi (%CV) belirlendi [428].

8.3. RT-PCR ve MLPA Verilerinin Demografik Gruplara Göre İncelenmesi

RT-PCR ve MLPA verilerinin, demografik verilere göre kategorize edilen örnek grupları arasında karşılaştırılması için ANOVA seçildi. ANOVA ile, her bir gene ait verilerin farklı demografik kategorilerdeki örnek grupları arasında herhangi bir fark olup olmadığı parametrik olarak sınıandı. Olasılık (p) değerinin 0,05’ten küçük olduğu durumlarda, demografik gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar olduğu kabul edildi.

8.4. RT-PCR ve MLPA Verilerinin Kendi İçlerinde İncelenmesi

RT-PCR ve MLPA verileri göz önüne alındığında benzer profil gösteren genler, korelasyon yöntemiyle belirlendi. RT-PCR gen ifade verilerinin birbirleriyle ve MLPA verilerinin birbirleriyle olan ilişkilerini görmek amacıyla ilgili verilere, parametrik olmayan bir analiz olan “Spearman’ın Sıralama Katsayısı”nın belirlendiği korelasyon analizi uygulandı. Korelasyon katsayısının (r), 1’e yakın olduğu durumlarda ilişkinin kuvvetli olduğu; pozitifliğinin doğru orantı, negatifliğinin ise ters orantı anlamına geldiği kabul edildi.

Korelasyon analizleri ile gruplar arasında anlamlı ilişkiler bulunan durumlarda, söz konusu benzerlik ve farkların, ilişkili değişkenlerin hangi kategorik alt gruplarından kaynaklandığı, parametrik “Multivaryat Varyans Analizi (MANOVA)” çok değişkenli karşılaştırma testleri ile incelendi. Olasılık (p) değerinin 0,05’ten küçük olduğu korelasyonlara sebep olan bağımsız değişken kategorileri belirlendi.

Ayrıca korelasyon, ağ grafiğiyle gösterilerek görsel açıdan ifade edildi. Her bir daire bir geni temsil edecek, dairelerin çapı, diğer genlerle olan ilişkinin sayıca fazlalığını; bağlantıların kalınlığı ise r ’nin kuvvetini gösterecek şekilde ağ grafikleri hazırlandı. Pozitif korelasyonlar, kırmızı olarak gösterildi.

8.5. RT-PCR ve MLPA Verilerinin Birbirlerine Göre İncelenmesi

Her bir gene ait MLPA Skoru ile normalize RT-PCR değerlerinin ilişkisi ise parametrik olmayan “Mann Whitney U Testi” ve “Ki-Kare Testi” ile incelendi. PCR ve

MLPA için yapılan parametrik olmayan istatistiksel analizlerde girdi olarak sırasıyla ve ayrı ayrı Normalize Ekspresyon Değerleri ve kategorize ekspresyon skorları; Beta skorları ve de kategorize Beta skorları kullanıldı. Ayrıca çalışmanın gücünü arttırabilmek açısından, aynı gene ait birden fazla metilasyon bölgesine bakıldığı durumlarda, iki bölgenin sonuçları “veya” matematik işlemcisi ile birleştirildi. Benzer şekilde, kategorik beta skoru 2, 3 ve 4 olan alt gruplar da grup altında birleştirildi. Bu sayede karşılaştırılan alt gruplardaki örnek sayısını arttırılmış oldu.

8.6. Kümeleme Analizi ve Dendrogramlar

Tüm grupların birbiri ile ilişkisini incelemek üzere kümeleme analizleri gerçekleştirildi. Uygulanan çoklu karşılaştırma testleri ile MLPA sonuçları açısından ve RT-PCR sonuçları açısından istatistiksel açıdan anlamlı farklılıkların gözleendiği durumlar belirlendi ve, her bir durumda ilgili genlerin hangi grupları istatistiksel açıdan anlamlı olarak ayırabildiği kümeler hiyerarşik olarak dendrogramlar (ağaç grafikleri) ile görselleştirildi [399,429,430]. Bu sayede oluşan ağaç üzerinde, benzerlikleri göze alınarak hiyerarşik olarak sınıflandırılan genler ve örnekler, ağacın orijinine yaklaştıkça aralarındaki mesafe monoton artacak ve her bir düğümün yüksekliği de gruplar arası farklılıkları belirtecek şekilde gösterilmiş oldu.

9. ÇALIŞMANIN SINIRLILIKLARI

9.1. Çalışma İçi Kontrol ve Tekrarlar

Gerçek Zamanlı Kantitatif *PCR* (*RT-qPCR*) sonuçlarındaki varyasyonlar ham Ct değerleri üzerinden değerlendirildi. Sonuçlar değerlendirilirken, duplike örnekler arasında Ct farkı >1.0 olan örnekler de değerlendirmeye alınmayarak tekrarlandı. Ayrıca plak (her bir 96'lı PCR grubu) içi ve plaklar arasında kontrol örnekleri arasındaki Ct farkına ait Sapma katsayısı yüzdesi (%CV) %5'den büyük olan çalışma plakları komple tekrarlandı.

MLPA sonuçları değerlendirilirken, farklı fragman analizi parametreleri ile analizlere rağmen beklenen tüm bantların görülemediği örneklerde fragman separasyonu işlemi tekrarlandı. Yine sonrası sonuç alınamayan örneklerden DNA kalitesi kötü olanlar hariç *MLPA PCR* reaksiyonları bir kez daha tekrarlandı. Ayrıca, fragman ayrımı sonrasında *MLPA* normalizasyonu sırasında, eksponansiyel eğriye yaklaştırma işlemi sonucunda %20'nin üzerinde varyans gösteren testler tekrarlandı.

9.2. Çalışma Dışı Bırakılan Örnekler ve Testler

DNA miktarı 50ng/µl altında, saflığı 1.7-1.9 arası olmayan örnekler ile; tekrarlanan *PCR* reaksiyonları sonrasında da tüm prop pikleri gözlenemeyen örnekler çalışma dışı bırakıldı.

MLPA fragman separasyonunun tekrarı sonrasında normalizasyonda, eksponansiyel eğriye yaklaştırma işleminde çok fazla varyans gösteren örnekler ($CV > \%20$) çalışma dışı bırakıldı.

Böylece toplamda 10 tümör dokusu ve 13 komşu doku ile 1 sağlıklı normal kontrol çalışma dışı bırakılmış oldu. Ayrıca demografik verileri kısmen eksik olan 4 hasta da sadece ilgili istatistik değerlendirmeler yapılırken hesaba katılmadı.

Bu çalışmada, *MLPA* tekniği ile sonuçları elde edilen gen grubundan, sadece gerçek zamanlı *PCR* verisi olan 23 gen analiz edildi. Diğer 12 genin *MLPA* sonuçları bu çalışma kapsamında incelenmedi.

9.3. Örneklem büyüklüğü

Çalışma bütçesi ve zamanı çerçevesinde seçilen örneklem, evreni temsil etmekte güçsüz kalmış olabilir. Yazılı onam veren sağlıklı bireylerin azlığından, sağlıklı normal grup az sayıdadır. Ayrıca heterojen bir yapı sergileyen meme kanserinde, bağımsız değişkenlerin öklit dağılımı içerisinde olması mümkün değildir.

10. ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik ve Laboratuvar Araştırma Etik Kurulu 06.04.2006 tarih ve 88 sayılı kararı uyarınca başlamış ve projedeki değişiklikler de 08/11/2012 tarih ve 36-07 sayılı yazısında belirtildiği üzere bildirilmiştir (Bkz. Ek 1, 2).

Bu projede kullanılan beşeri materyal, yine Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik ve Laboratuvar Araştırma Etik Kurulu 30.11.2004 tarih 01/15/04 – 559 nolu toplantısında alınan rapor dahilinde kurulan ve 03.02.2006 tarih ve 03 sayı ile değişik proje kapsamında yazılı bilgilendirilmiş onamları ile toplanmıştır.

IV. BULGULAR

1. OLGULAR

Çalışmaya dahil edilen ve çalışma sonunda istatistiksel analiz için değerlendirilmeye alınmayanlar hariç olmak üzere) demografik ve klinik özelliklere göre dağılımı aşağıda verilmiştir (Tablo 10-12).

Tablo 10. Olguların Histolojik Olarak Gruplandırılması

Histolojik Tip	İlk Olgu Sayısı	Çalışma Sonu Olgu Sayısı
Duktal	6	6
Lobüler	7	4
Miks	8	6
Benign / in-situ	1	1
Diğer	4	3
Sağlıklı Normal	4	3
Toplam	30	23

Çalışmaya dahil edilen ve değerlendirmeye alınan tümör olgularının tamamı dişi olup, ortalama yaş sırasıyla 55,9 ve 55,4 idi. Sağlıklı kontrollerin de yine tamamı dişi olup, ortalama yaş 31,5 ve 31,7 idi.

Tablo 11. Olguların evrelere göre gruplandırılması

Evre	İlk Olgu Sayısı	Çalışma Sonu Olgu Sayısı
0	1	1
I	4	2
II	13	10
III	6	5
IV	2	2
Sağlıklı	4	3
Toplam	30	23

Tablo 12. Olguların invazyon durumuna göre gruplandırılması

İnvazyon Durumu	İlk Olgu Sayısı	Çalışma Sonu Olgu Sayısı
Lenf Düğümü Tutulumu Yok	15	11
Lenf Düğümü Tutulumu Var / Uzak Metastaz Yok	9	7
Lenf Düğümü Tutulumu Var / Uzak Metastaz Var	2	2
Sağlıklı	4	3
Toplam	30	23

2. GERÇEK ZAMANLI PCR (*REAL TIME PCR*) ÇALIŞMALARI

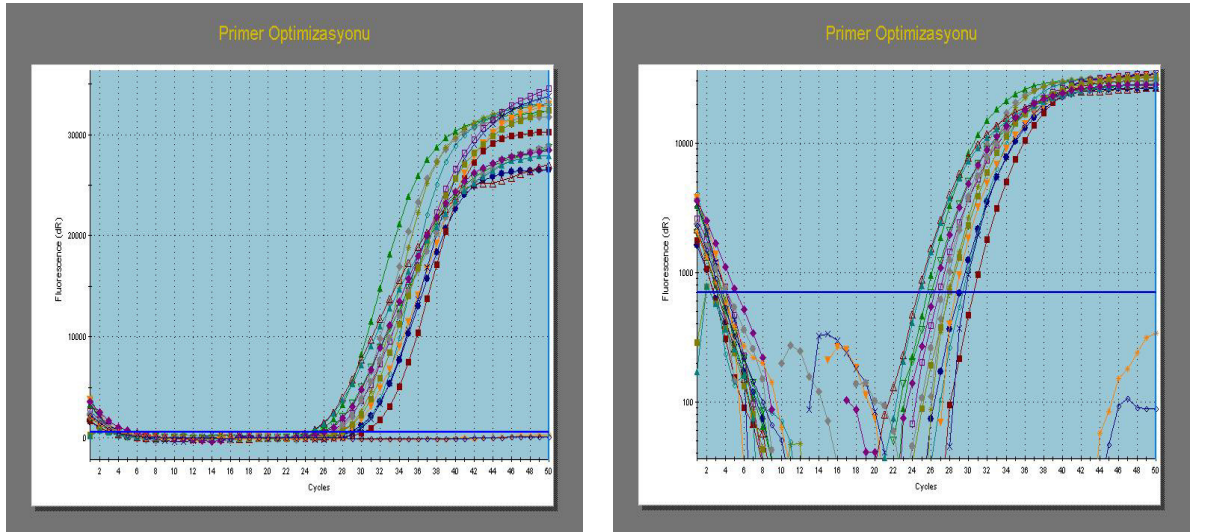
2.1. RNA miktarı ve saflığı

Bu çalışmada elde edilen RNA çözeltilerinin A_{260}/A_{280} oranları 1,95-2,12 arasında değişmekteydi. Aritmetik ortalaması (M) ($\pm\sigma$) ise $2,01(\pm 0,03)$ idi.

2.2. Primer Optimizasyonu

B2M geninin farklı konsantrasyonlardaki Ct değerleri Tablo 13’de gösterilmiştir. A5-D5 Serisi, her iki primerin 0.2 μM final konsantrasyonunda olup en düşük Ct’ye sahipti.

En düşük Ct ve en yüksek R (*baseline*’dan çıkarılan floresan okuma) değerlerine sahip olan 0.2 μM konsantrasyon, geçerli konsantrasyon olarak kabul edildi. Şekil 29’da Stratagene Mx3000P Real Time PCR cihazından alınan bir geninin amplifikasyon grafikleri görülmektedir.



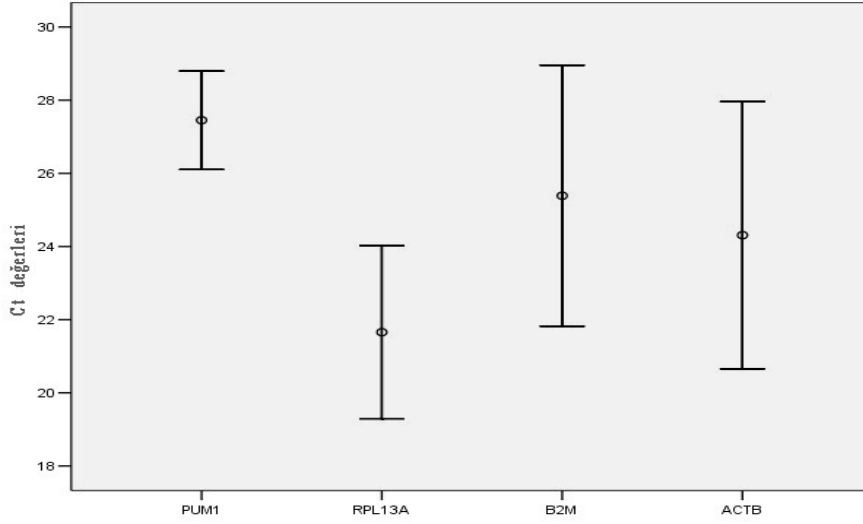
Şekil 29. ACTB geni için normal ölçekli ve logaritmik amplifikasyon grafikleri

Tablo 13. ACTB geni için farklı konsantrasyonlardaki Ct değerleri

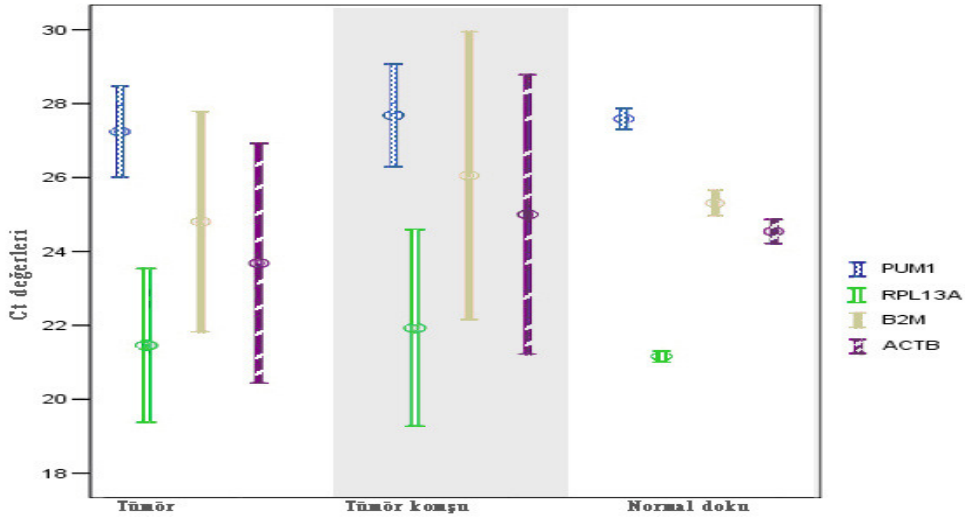
Kuyu no.	Floresan Kanalı	Tip	Eşik (dR)	Ct (dR)	RSq (dR)
A1	FAM	Standard	262,518	30,04	0,999
B1	FAM	Standard	262,518	30,08	0,999
C1	FAM	Standard	262,518	30,05	0,999
D1	FAM	Standard	262,518	30,05	0,999
A2	FAM	Standard	262,518	28,04	0,999
B2	FAM	Standard	262,518	28,11	0,999
C2	FAM	Standard	262,518	28,15	0,999
D2	FAM	Standard	262,518	28,10	0,999
A3	FAM	Standard	262,518	28,60	0,999
B3	FAM	Standard	262,518	28,62	0,999
C3	FAM	Standard	262,518	28,63	0,999
D3	FAM	Standard	262,518	28,60	0,999
A4	FAM	Standard	262,518	28,05	0,999
B4	FAM	Standard	262,518	28,09	0,999
C4	FAM	Standard	262,518	28,27	0,999
D4	FAM	Standard	262,518	28,60	0,999
A5	FAM	Standard	262,518	25,29	0,999
B5	FAM	Standard	262,518	25,27	0,999
C5	FAM	Standard	262,518	25,27	0,999
D5	FAM	Standard	262,518	25,28	0,999
A6	FAM	Standard	262,518	27,78	0,999
B6	FAM	Standard	262,518	27,97	0,999
C6	FAM	Standard	262,518	27,90	0,999
D6	FAM	Standard	262,518	27,77	0,999
A7	FAM	Standard	262,518	27,99	0,999
B7	FAM	Standard	262,518	28,01	0,999
C7	FAM	Standard	262,518	27,98	0,999
D7	FAM	Standard	262,518	27,98	0,999
A8	FAM	Standard	262,518	28,09	0,999
B8	FAM	Standard	262,518	28,71	0,999
C8	FAM	Standard	262,518	28,65	0,999
D8	FAM	Standard	262,518	28,62	0,999
A9	FAM	Standard	262,518	27,69	0,999
B9	FAM	Standard	262,518	27,71	0,999
C9	FAM	Standard	262,518	27,71	0,999
D9	FAM	Standard	262,518	27,70	0,999
A10	FAM	NTC	262,518	No Ct	0,999
A11	FAM	NTC	262,518	No Ct	0,999
A12	FAM	NTC	262,518	No Ct	0,999

2.3. Referans Genler

Dört aday referans genin invazif meme kanseri, tümör çevresi ve sağlıklı normal meme dokusundaki ekspresyon seviyeleri doku ayırımı yapmadan ve yaparak ayrı ayrı aşağıda gösterilmiştir (Şekil 30 ve 31). Değerler, standart sapmalarıyla birlikte, Ct ortalamaları olarak gösterilmiştir.



Şekil 30. Aday referans genlerin meme dokusunda ekspresyon seviyeleri

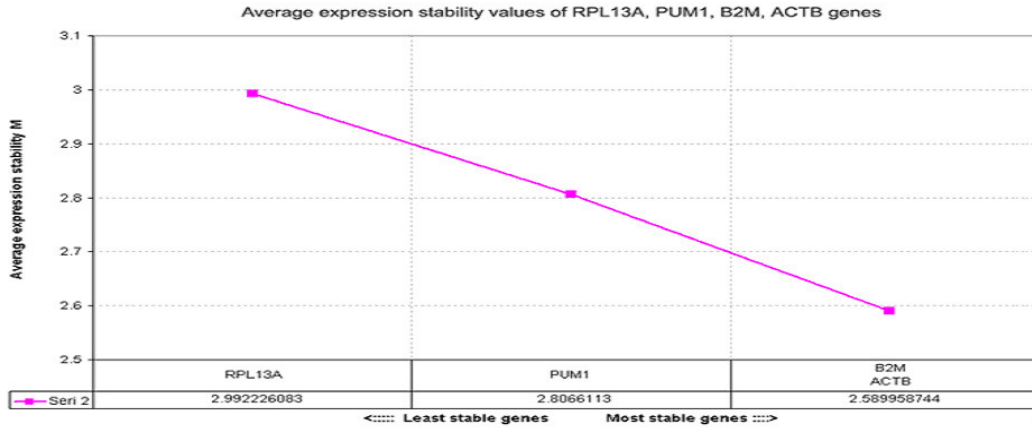


Şekil 31. Aday referans genlerin doku grubuna göre ekspresyon seviyeleri

İnvazif meme kanseri, tümör komşu doku ve sağlam meme dokusu verilerinin tümü ele alındığında, aday referans genlerin NormFinder ve Genorm yazılımları ile stabilitesine göre sıralaması sırasıyla Tablo 14 ve Şekil 32’de gösterildi.

Tablo 14. NormFinder ile aday referans gen sıralaması

Sıralama	Aday genler	Stabilite değeri	Standart hata
1	PUM1	0,259	0,104
2	RPL13A	0,525	0,074
3	B2M	0,774	0,076
4	ACTB	1,365	0,102

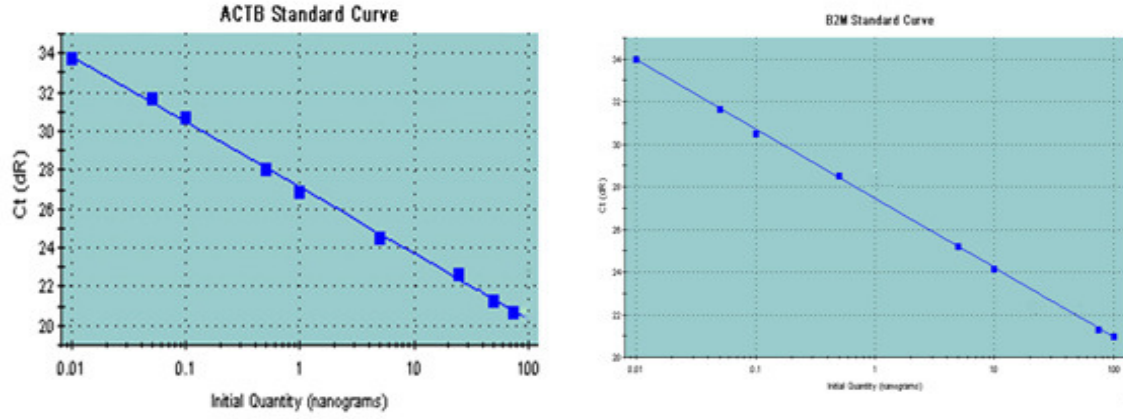


Şekil 32. Genorm ile aday referans genlerin ekspresyon stabiliteleri

En stabil gen çifti olan RPL13A/PUM1 ikilisine göre her bir örnek için hesaplanan normalizasyon katsayıları 0,02 ile 21,27 arasında değişmekteydi ($4,71 \pm 2,9$) (Bkz. Ek 3).

2.4. Standart Eğriler ve Amplifikasyon Verimleri

ACTB ve B2M genlerinin standart eğrileri Şekil 33’te gösterildi.



Şekil 33. Standart eğri örnekleri: ACTB ve B2M genlerinin standart eğrileri

Referans ve diğer tüm genlerin verimlilikleri, çizilen ilgili standart eğrisinden elde edildi. Mx3000P programı ile hesaplanan verimlilik $99,96 \pm 2,86$, eğimin belirleyicilik katsayısı (R^2) ise $0,995 \pm 0,004$ olup, tüm değerler ve Tablo 15’de gösterildi.

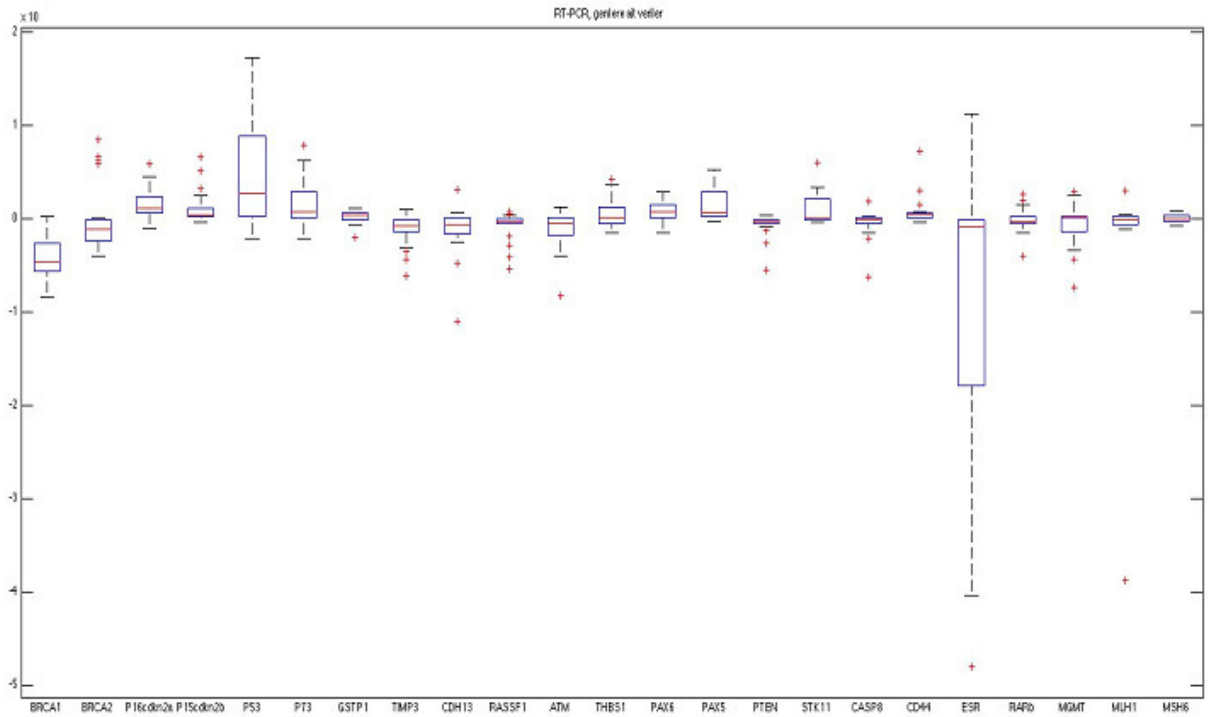
Tablo 15. Standart eğrilerden elde edilen gen amplifikasyon verimlilikleri

Gen	Verimlilik	Eğim	Belirleme	Gen	Verimlilik	Eğim	Belirleme
ATM	101,3	3,291	0,989	PAX6	100,4	3,313	0,998
BRCA1	102,4	3,265	0,994	PTEN	100,6	3,308	0,992
BRCA2	100,1	3,32	0,987	RARB	100,4	3,313	0,998
CASP8	100,8	3,202	0,997	RASSF1	100,6	3,308	0,992
CD44	100,4	3,312	0,999	STK11	100,4	3,312	0,991
CDH13	99,8	3,326	0,997	THBS1	99,0	3,346	0,992
ESR1	101,0	3,299	0,999	TIMP3	99,4	3,337	0,999
GSTP1	100,2	3,318	1,000	TP53	100,0	3,323	0,992
MGMT	99,9	3,324	0,994	TP73	100,7	3,301	0,995
MLH1	99,6	3,331	0,991	ACTB	100,2	3,318	1,000
MSH6	101,4	3,327	0,996	B2M	86,1	3,717	0,999
CDKN2B	101,2	3,293	0,989	PUM1	101,4	3,327	0,996
CDKN2A	100,0	3,322	1,000	RPL13A	101,0	3,288	0,998
PAX5	100,6	3,308	1,000				

2.5. Gen Ekspresyonu Verileri (Normalize RT-PCR Sonuçları)

Gerçek zamanlı PCR sonrasında elde edilen veriler normalize edilmiş halde tablo haline getirilmiştir (Bkz. Ek 4). Pozitif sayılar ekspresyon artışlarını, Negatif sayılar ise ekspresyon azalışlarını kat olarak göstermektedir.

Analizlere dahil edilen örneklerin her bir RT-PCR verisi için genlere ait değerler ve ortalamadan sapma miktarları kutu grafiği ile gösterilmiştir (Şekil 34).



Şekil 34. Gen ekspresyonu değerlerinin kutu grafiği ile gösterimi

2.6. Çalışma içi kontroller ve çalışmalar arası varyasyon

Gerçekleştirilen tüm kantitatif (q)RT-PCR deneylerinin yüzde varyasyon katsayıları (%CV) 10 ng/μl ve 1 ng/μl konsantrasyonları için sırasıyla çalışma içi 0,0342 ve 0,042 idi. Çalışmalar arası % CV ise aynı konsantrasyonlar için sırasıyla 0,042 ve 0,024 idi.

2.7. Gen Ekspresyonundaki Değişiklikler

Normalizasyon sonrasında, sağlıklı normal meme dokusuna oranla artmış ve azalmış ekspresyon gösteren gen ve hasta sayıları Tablo 16’da özetlenmiş, detaylı olarak ise Tablo 17’de gösterilmiştir. Tablo 18 ise tümör ve komşu normal dokularda gen bazında ekspresyon değişikliklerinin sıklığını listelemektedir.

Tablo 16. Doku bazında ekspresyon değişikliği oranları

	Tümör doku	Komşu normal doku	Sağlıklı normal doku
Artmış ekspresyon gösteren gen sayısı	10,75±4,69	3,60±4,62	0
Azalmış ekspresyon gösteren gen sayısı	8,85±4,38	15,4±6,50	0
Değişmiş ekspresyon gösteren gen sayısı	20,5±1,50	19±1,63	0
En az bir azalma gösteren hasta sayısı	19 (%100)	5 (%100)	0
En az bir artış gösteren birey sayısı	19 (%100)	3 (%60)	0
En az bir değişiklik gösteren birey sayısı	19 (%100)	5 (%100)	0

2.8. Gen Ekspresyonu Isı Haritası (*HeatMap*)

Bu çalışmada, hasta ve komşu dokularda gen ekspresyon düzeyleri normal kontrollere oranla yaklaşık 172 kata kadar artma ve 481 kata kadar azalma görülmekteydi. Ortalama değişim miktarı ise 17,1 kattı. Her gen için tümör, komşu normal ve sağlıklı normal dokularda ne kadar ekspresyon değişikliği olduğu ise Tablo 19’da gösterilmiştir. Eksi olarak ifade edilen değerler o kadar kat azalmayı belirtmektedir. Genler arası değişim farkları büyük olduğundan, her gen kendi standart sapmasına göre değerlendirilerek renklendirildi. Normal dokulara oranla 1 kat değişme (değişme olmayan) siyah renk ile gösterilirken, maksimum oranlar en parlak renkler ile gösterildi. Kırmızı tonları azalmış, yeşil tonları ise artmış ekspresyonu göstermektedir (Şekil 35).

Tablo 17. Gen ekspresyonu normal meme dokusuna göre değişmiş olan bireyler

örnek no	22T	23T	24T	25T	26T	29T	30T	31T	32T	50T	52T	54T	55T	56T	58T	60T	61T	62T	64T	66B	22N	31N	61N	62N	64N	NN1	NN2	NN3
ATM	+	+	+	+	+	-	-	°	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	°	-	-	-	-	-	-	-
BRCA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BRCA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CASP8	+	-	°	+	°	°	-	-	°	+	°	+	+	-	°	-	-	-	-	-	°	-	-	-	-	-	-	-
CD44	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	°	-	-	-	-	-	-	-
CDH13	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDKN2A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	°	-	-	-	-	-	-	-
CDKN2B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ESR1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GSTP1	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MGMT	+	-	-	+	°	-	-	-	+	°	°	°	°	°	°	°	°	°	°	°	°	-	-	-	-	-	-	-
MLH1	°	-	-	-	°	°	°	-	+	+	+	+	+	+	°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSH6	+	°	+	+	°	°	°	°	°	-	-	-	-	-	°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAX5	+	+	+	+	°	°	°	°	°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
PAX6	+	°	+	+	°	°	°	°	°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	°	-	-	-	-	-	-	-	-
PTEN	-	-	-	°	-	-	-	-	°	°	°	°	°	°	°	°	°	°	°	°	°	-	-	-	-	-	-	-
RARB	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RASSF1	-	-	°	°	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	°	°	°	°	°	-	-	-	-	-	-	-	-
STK11	+	-	+	+	+	°	-	+	°	°	°	°	°	°	°	°	°	°	°	°	-	-	-	-	-	-	-	-
THBS1	+	°	+	+	-	-	-	-	°	°	°	°	°	°	°	°	°	°	°	°	°	-	-	-	-	-	-	-
TIMP3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TP53	+	°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	°	-	-	-	-	-	-	-
TP73	+	+	+	+	+	+	+	°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	°	-	-	-	-	-	-	-

Artı (+) işareti sağlıklı normal meme dokusuna kıyasla 1,5 kat ve üzeri artışı, Eksisi (-) işareti 1,5 kat ve üzeri olan azalmayı, Nokta (°) işareti ise 1,5 katın altındaki değişiklikleri ifade etmektedir.

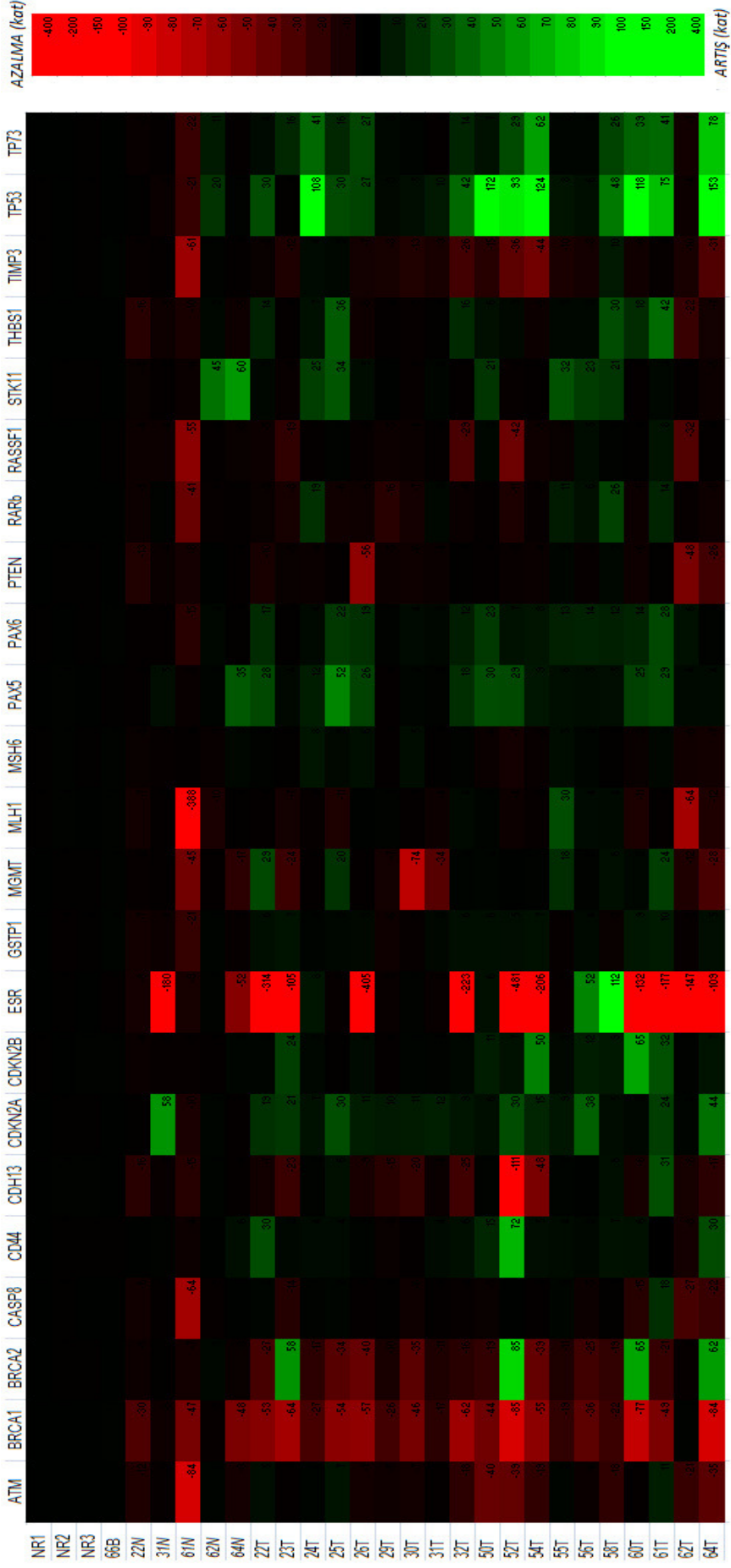
Tablo 18. Gen bazında ekspresyon değişikliklerinin sıklığı

Tümör dokular							
	Azalmış	Artmış	Değişmemiş		Artmış	Azalmış	Değişmemiş
BRCA1	%90	%0	%10	CDKN2A	%95	%0	%5
TIMP3	%80	%15	%5	PAX5	%90	%0	%10
BRCA2	%75	%20	%5	TP53	%85	%5	%10
ESR1	%70	%20	%10	TP73	%85	%5	%10
PTEN	%65	%10	%25	PAX6	%80	%0	%20
RARB	%60	%30	%10	CD44	%75	%15	%10
ATM	%60	%25	%15	CDKN2B	%75	%0	%25
CDH13	%60	%25	%15	GSTP1	%70	%25	%5
RASSF1	%55	%20	%25	THBS1	%55	%30	%15
CASP8	%50	%20	%30	STK11	%50	%30	%20
MLH1	%45	%30	%25	MGMT	%35	%45	%20
				MSH6	%30	%40	%30

Komşu normal dokular							
	Azalmış	Artmış	Değişmemiş		Artmış	Azalmış	Değişmemiş
PTEN	%25	%0	%75	GSTP1	%10	%5	%85
TP53	%25	%0	%75	TP73	%15	%10	%75
STK11	%20	%5	%75	CDH13	%5	%5	%90
CDKN2A	%20	%5	%75				
CDKN2B	%20	%0	%80				
PAX6	%20	%0	%80				
CASP8	%20	%5	%75				
PAX5	%20	%5	%75				
TP73	%20	%0	%80				
GSTP1	%20	%5	%75				
CDH13	%20	%0	%80				
MSH6	%15	%5	%80				
MGMT	%15	%5	%80				
MLH1	%15	%5	%80				
CD44	%15	%10	%75				
BRCA1	%15	%0	%85				
BRCA2	%15	%5	%80				
RARB	%15	%0	%85				
ATM	%15	%0	%85				
ESR1	%10	%5	%85				

Tablo 19. Gen bazında ortalama ekspresyon değişiklikleri (kat olarak)

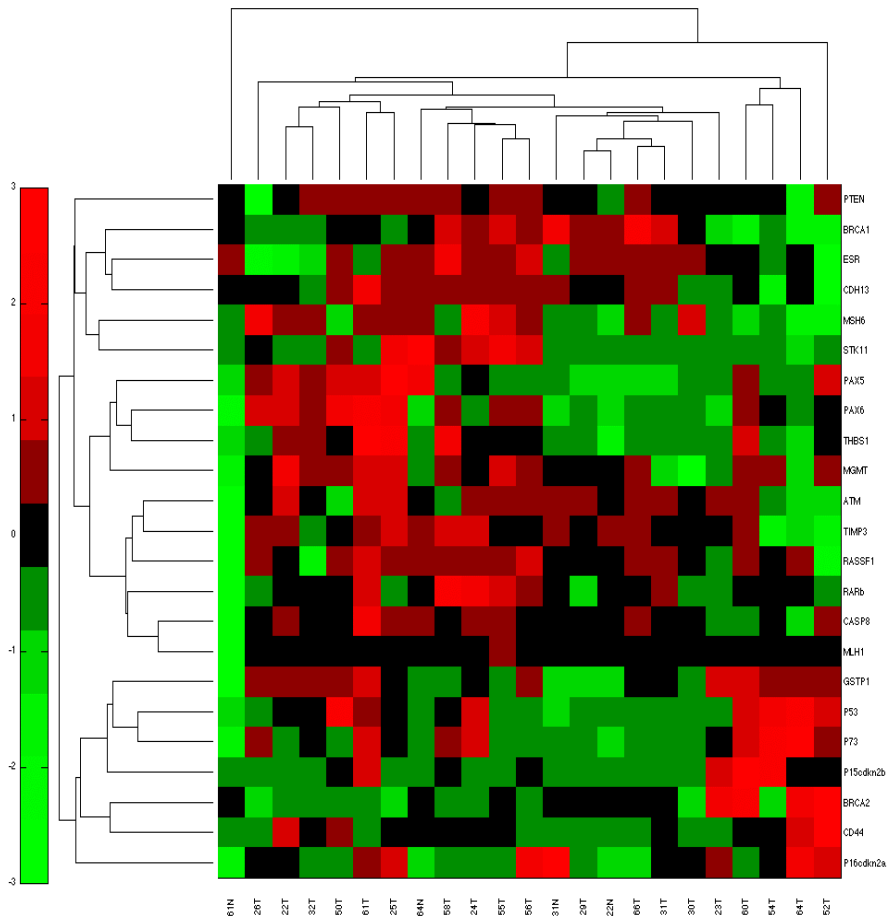
	ortalama			st.sapma			minimum			maksimum		
	tümör	komşu	normal	tümör	komşu	normal	tümör	komşu	normal	tümör	komşu	normal
ATM	12,8	18,1	1,0	12,9	33,0	0,0	-40,2	-83,6	1,0	11,4	-1,0	1,0
BRCA1	43,4	22,4	1,0	25,6	22,7	0,0	-84,7	-48,2	1,0	1,2	0,0	1,0
BRCA2	31,5	3,3	1,0	22,2	3,6	0,0	-40,2	-6,8	-1,0	84,7	1,4	1,0
CASP8	6,7	12,6	1,1	8,2	25,5	0,0	-27,4	-63,6	-1,1	18,4	59,7	1,1
CD44	10,9	2,5	1,0	17,0	3,4	0,0	-7,9	-4,4	-1,0	71,8	1,1	1,0
CDH13	18,0	6,3	1,2	25,5	7,8	0,1	-110,7	-15,7	1,0	30,6	1,6	1,3
CDKN2A	16,1	12,3	1,0	12,2	24,9	0,0	2,1	-10,0	-1,1	44,3	2,7	1,0
CDKN2B	12,7	2,3	1,1	18,1	2,4	0,1	-1,4	-3,7	-1,0	65,3	58,3	1,2
ESR	131,0	42,0	1,0	143,0	70,8	0,1	-481,0	-180,4	-1,1	112,2	5,9	1,0
GSTP1	4,8	6,3	1,1	2,4	8,3	0,1	-5,5	-20,5	-1,2	10,3	10,5	1,0
MGMT	15,2	11,3	1,0	18,2	17,8	0,0	-74,0	-44,6	-1,0	28,5	1,3	1,0
MLH1	8,9	68,2	1,1	15,1	157,0	0,2	-64,4	-388,0	-1,0	30,1	1,3	1,4
MSH6	3,7	2,5	1,1	2,4	2,5	0,1	-7,5	-3,3	-1,0	8,5	1,4	1,2
PAX5	15,3	8,0	1,1	14,3	14,6	0,1	-1,2	-3,1	1,0	52,2	2,4	1,2
PAX6	10,9	4,0	1,1	8,1	6,4	0,1	-1,0	-15,4	-1,1	28,3	2,4	1,1
PTEN	9,8	4,6	1,0	15,9	5,5	0,0	-55,9	-12,9	-1,0	2,6	35,3	1,0
RARb	8,2	8,6	1,0	6,5	16,2	0,0	-15,7	-40,5	1,0	25,7	1,4	1,1
RASSF1	9,0	11,6	1,1	12,2	21,2	0,1	-42,4	-54,8	1,0	7,5	1,6	1,1
STK11	9,8	19,1	1,0	11,6	28,5	0,0	-4,8	-4,0	-1,1	33,8	1,0	1,0
THBS1	11,7	6,5	1,1	12,5	6,7	0,1	-21,7	-15,6	1,0	42,2	1,6	1,2
TIMP3	13,5	11,6	1,1	12,0	24,9	0,1	-44,3	-61,4	-1,1	9,9	2,0	1,1
TP53	55,6	8,2	1,0	55,9	13,3	0,0	-4,3	-21,5	-1,0	172,4	2,3	1,0
TP73	21,9	6,6	1,0	22,1	10,7	0,0	-6,9	-22,2	-1,0	77,7	20,0	1,1



Şekil 35. Gen ekspresyonunu gösterir ısı haritası (Heatmap)

2.9. PCR Verileri Arasında Korelasyonlar

Analizlere konu olan örnekler temel alınarak, her bir RT-PCR verisi için genlere ait değerlerin birbirleriyle daha kolay kıyaslanabilmeleri amacıyla genler arası ve örnekler arası korelasyon değerleri hesaplanarak her bir veri kümesi için dendogramlar oluşturulmuş ve ısı haritası (*heat map*) üzerinde gösterilmiştir (Şekil 36).

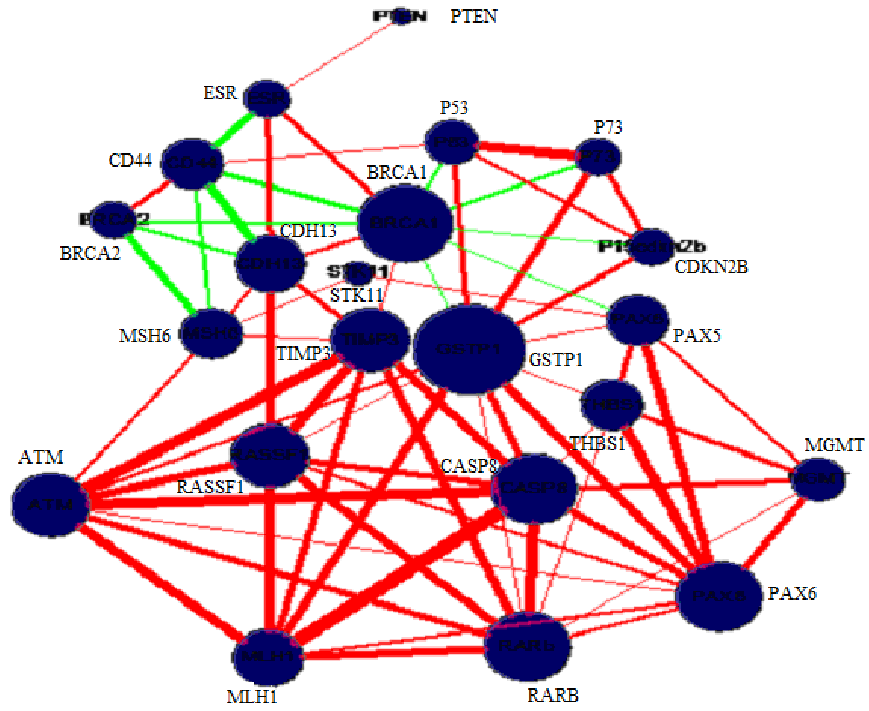


Şekil 36. qRT-PCR verisinin dendogramı ve ısı haritası. Verinin medyanına denk gelen değerler siyah ile gösterilmiş olup, standart sapmaya göre renklendirme ölçütü sol taraftaki lejantta gösterilmiştir.

Her gen için qPCR sonuçlarının birbiri ile korelasyonu hesaplanmış olup (Bkz. Ek 5), güçlü korelasyonlar ($r > 0,7$) Tablo 20’de gösterilmiştir. Ayrıca tüm korelasyonlar ağ grafiği ile ifade edilmiştir (Şekil 37). Şekilde yalnızca istatistiksel açıdan zayıf olmayan gen ilişkileri gösterilmiştir. Tabloda yer alan değerler, korelasyon katsayısı olan “ r ” değerini göstermektedir. r değerinin 1 veya -1’e yakın olması, ilişkinin kuvvetli olduğunu göstergesidir.

Tablo 20. Ekspresyon değişiklikleri arasında güçlü korelasyon olan genler (r değerleri)

	ATM	CASP8	CDH13	MLH1	PAX6	RARb	RASSF1	THBS1	TIMP3	TP53	TP73
ATM	.	0,78	.	0,75	.	.	0,71	.	0,8	.	.
CASP8	0,78	.	.	0,88	.	0,72
CD44	.	.	-0,71
MLH1	0,75	0,88
PAX6	0,72	.	.	.
RARb	.	0,72
RASSF1	0,71	0,74	.	.
THBS1	0,72
TIMP3	0,8	0,74
TP53	0,77
TP73	0,77	.



Şekil 37. qRT-PCR verileri ile gerçekleştirilen korelasyon analizini gösteren gen ağı. Her bir daire bir geni temsil etmektedir. Dairelerin büyüklüğü, diğer genlerle olan ilişkinin sayıca fazlalığına işaret etmektedir. Bağlantıların kalınlığı korelasyon katsayısının (r 'nin) kuvvetli oluşunu gösterirken, kırmızı bağlantılar pozitif korelasyonu, yeşil bağlantılar ise negatif korelasyonu işaret etmektedir.

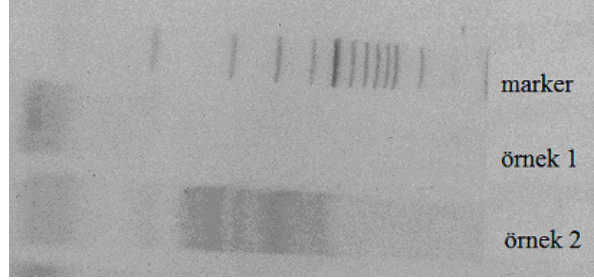
3. METİLASYON MLPA ÇALIŞMALARI

3.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu sonrası ölçülen konsantrasyonlar, yaklaşık 50-200 µg/ml ve A_{260}/A_{280} oranı ise 1,5-2,5 aralığındaydı (Bkz. Ek 6).

3.2. PAGE ile MLPA Amplifikasyon Kontrolü

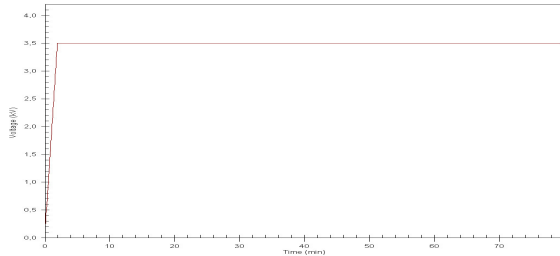
MLPA PCR ürünleri, kapiller elektroforez sistemine yüklenmeden önce yapılan PAGE sonrasında görüntülediğinde 60-500 baz arasında 50 civarı ampikon gözükmekteydi. PCR ürünlerine ait bantlar gözlenmeyen örneklerde ise MLPA PCR tekrar edildi (Şekil 38).



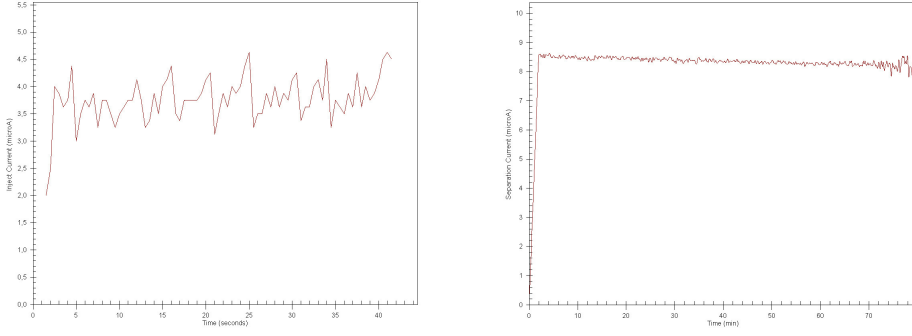
Şekil 38. MLPA PCR ürünlerinin PAGE jel görüntüsü. Örnek 1 hattında bant yok, MLPA tekrarlanacak. Örnek 2 hattında ise MLPA reaksiyonuna ait beklenen 50 civarı bant gözleniyor: Kapiller Elektroforez ile fragman ayrımı için uygun.

3.3. MLPA PCR Ürünlerinin Fragman Ayrıştırması

Kapiller Elektroforez sırasında ölçülen Gerilim ve Akım değerleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 39 ve 40).

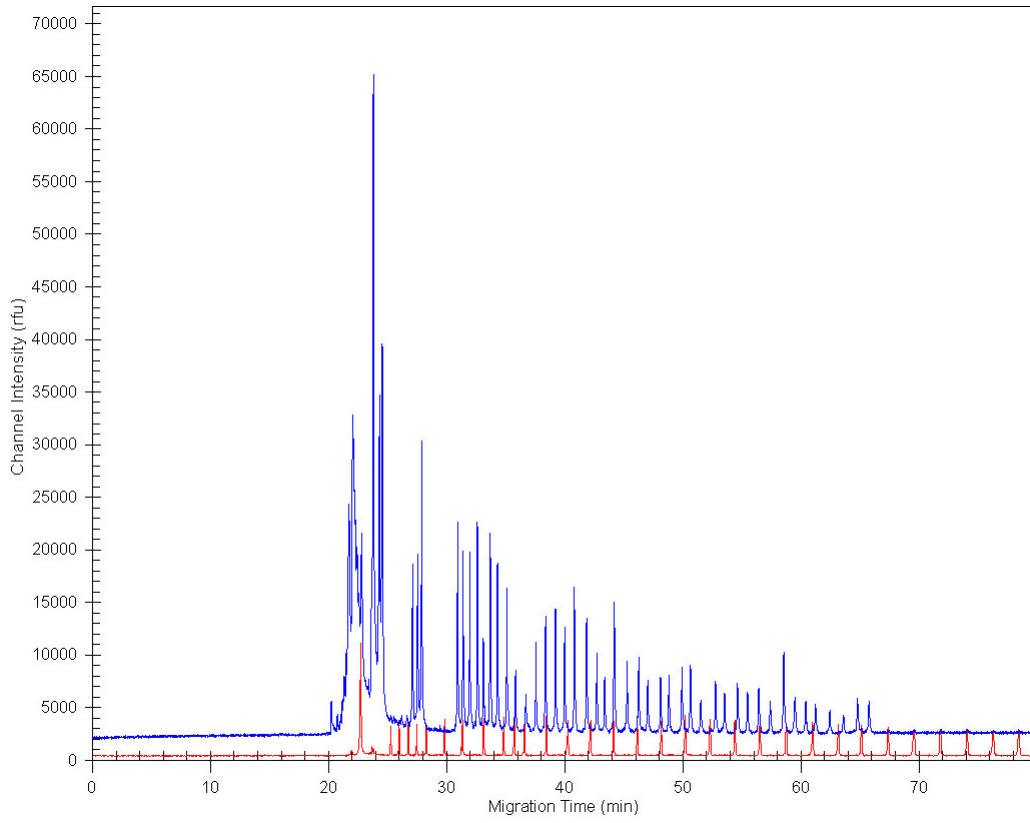


Şekil 39. Kapiller elektroforez ayrıştırma voltajı



Şekil 40. Kapiller elektroforez enjeksiyon ve ayrıştırma akımları

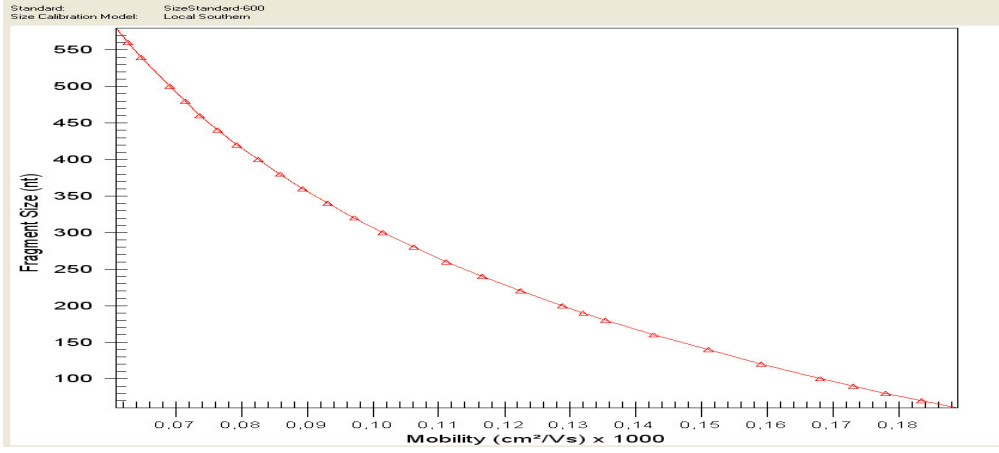
Kapiller elektroforez sisteminde koşturulan MLPA-PCR ürünlerinin cihaz tarafından ölçülen floresan değerleri şu şekilde görüntülenmekteydi (Şekil 41).



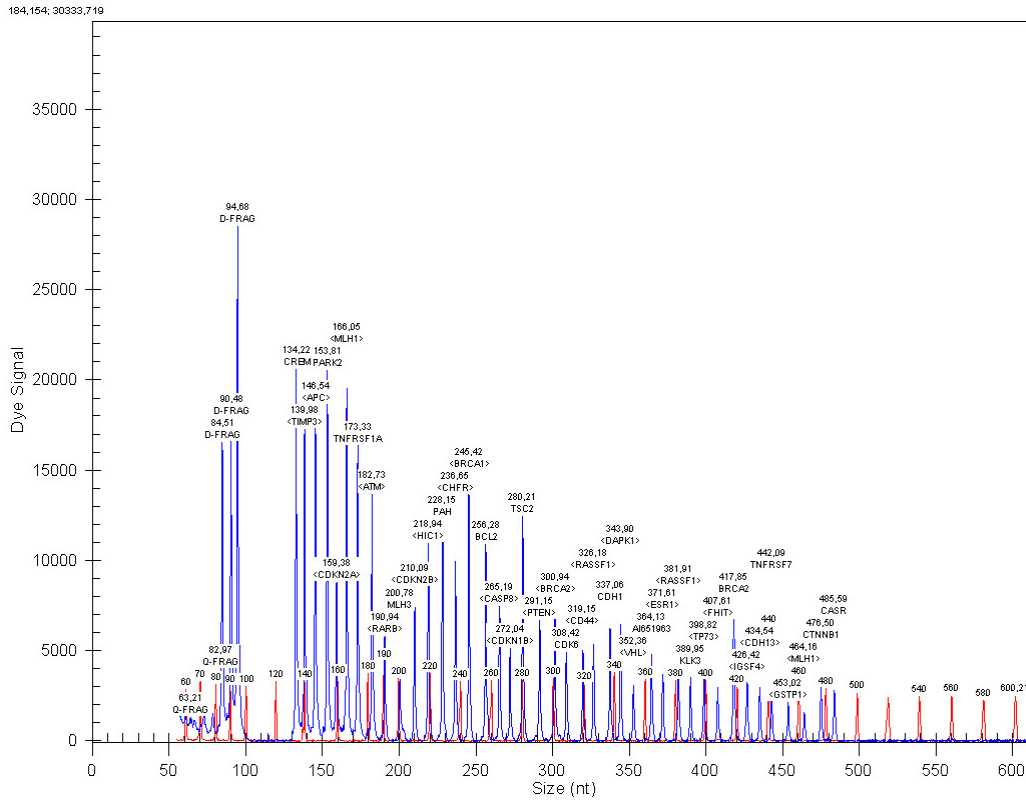
Şekil 41. Örnek bir ham veri

3.4. Fragman Analizi

Ham veriler *Local Southern* algoritması kullanılarak analiz edildi (Şekil 42 ve 43).



Şekil 42. Local Southern ile fragman büyüklüğü standart eğrisi hesabı



Şekil 43. Örnek bir fragman analizi sonrası veri görüntüsü

Fragman büyüklükleri, fragman analizi sonuçlarının işlenmiş elektroforez pik grafikleri (elektroferogramlar) ve fragman analizi sonucunda elde edilen pik değerlerinin listesi belirlenmiştir (Bkz. Ek 7-14).

Örnek DNA'larının metilasyona spesifik HhaI enzimi ile kesim öncesi ve sonrası ME001 ve ME002 kiti ile yapılan çalışmaların sonucunda elde edilen tüm örnekler için fragman büyüklükleri listelenmiştir (Bkz. Ek 15, 16, sırasıyla). Gözlenmeyen pikler, nokta (.) işareti ile gösterilmiştir.

3.5. MLPA Metilasyon Beta Skorları

Fragman analizi verilerinden hesaplanan tüm beta skorları (ME001 ve ME002 çalışmaları bir arada gösterilmiştir) listelenmiştir (Bkz. Ek 19). Parametrik olmayan istatistiksel analizlerde girdi olarak beta skorları yerine kategorize beta skorları kullanılmıştır (Bkz. Ek 20).

3.6. Metilasyon Durumunda Değişiklikler

Normalizasyon sonrasında, hipermetilasyon gözlenen genler Tablo 21'de özetlenmiş olup, detaylı olarak Şekil 44'te gösterilmiştir.

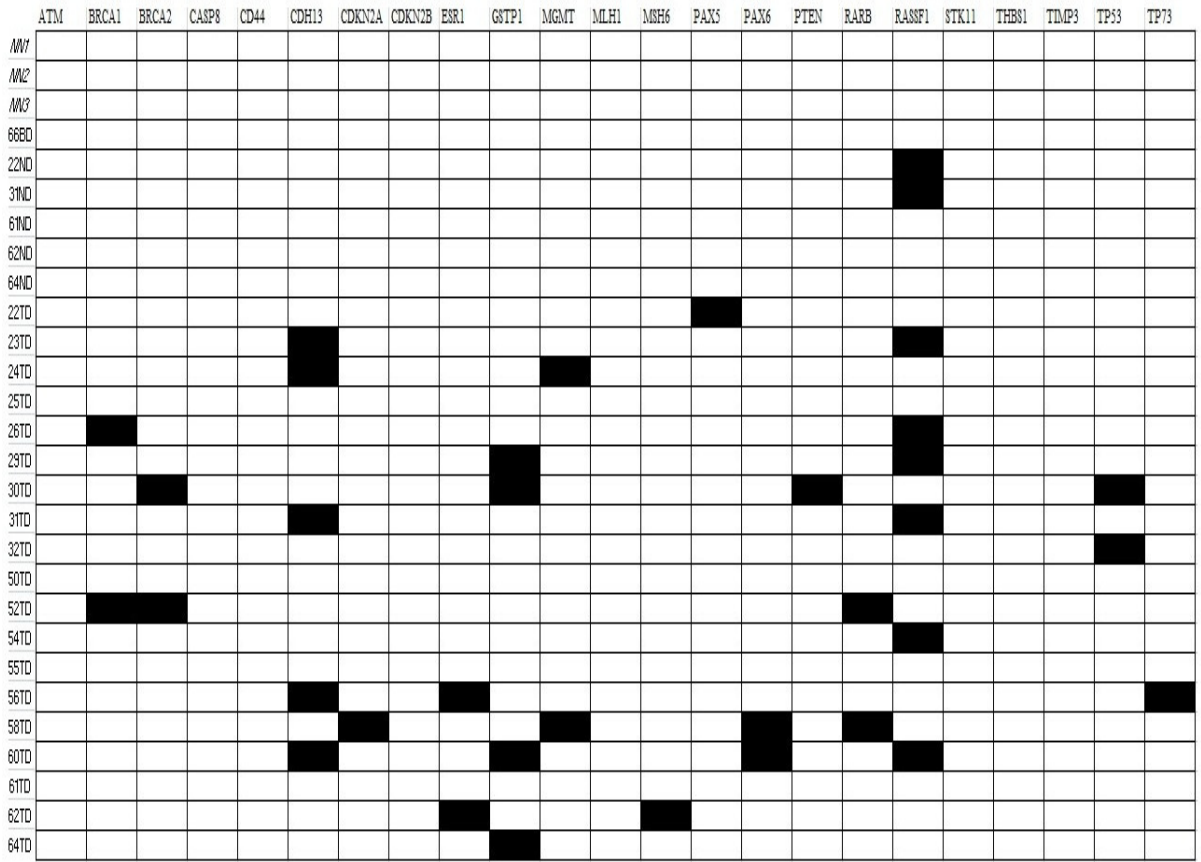
Tablo 21. Doku bazında hipermetilasyon durumları

	Tümör doku	Komşu normal doku	Sağlıklı normal doku
Hipermetilasyon gözlenen gen sayısı	3,20±2,26	0,60±0,55	0
En az bir hipermetilasyon gözlenen birey sayısı	18 (%95)	3 (%60)	0

Aynı gen ile ilgili birden fazla bölgenin çalışıldığı durumlarda, iki bölge “veya” işlemcisiyle birleştirilerek gösterilmiştir. Tablo 22'de aynı gene ait birden fazla bölge çalışılan durumlardaki metilasyon varlığında bölgelere göre metilasyon durumları gösterilmiştir (Bkz. Ek 21).

3.7. Metilasyon Isı Haritası (Heatmap)

Enzim kesimi sonrasında, enzim kesimi öncesine göre pik alanındaki yüzdesel değişme miktarına (Beta Skoru) göre hazırlanan sıcaklık haritası Şekil 45'te görülmektedir. Siyah gözüken bölgeler hiç metilasyon olmadığına (%0: sıfır), en parlak kırmızı renk ile ifade edilen bölgeler ise o bölgenin tamamen metile olduğuna (%100: yüz) işaret etmektedir. Kırmızının diğer tonları ile gösterilen bölgelerin ise parlaklıkları, metilasyon miktarı (%1-99) ile orantılıdır. Kategorize edilmiş beta skoruna göre ifade edilen yarı kantitatif sıcaklık haritası ise Şekil 46'da gösterilmiştir.

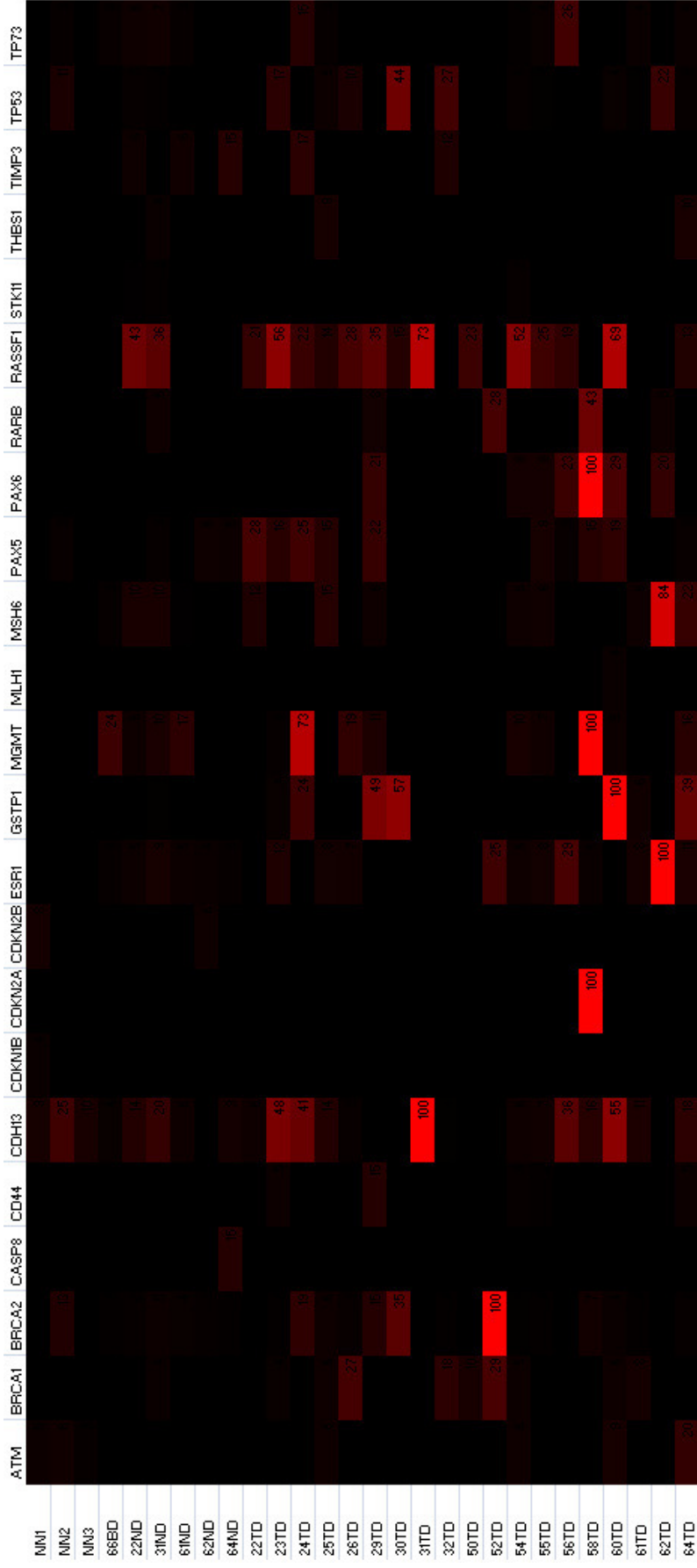


Şekil 45. Gen promotor bölgesinde hipermetilasyon gösteren bireyler

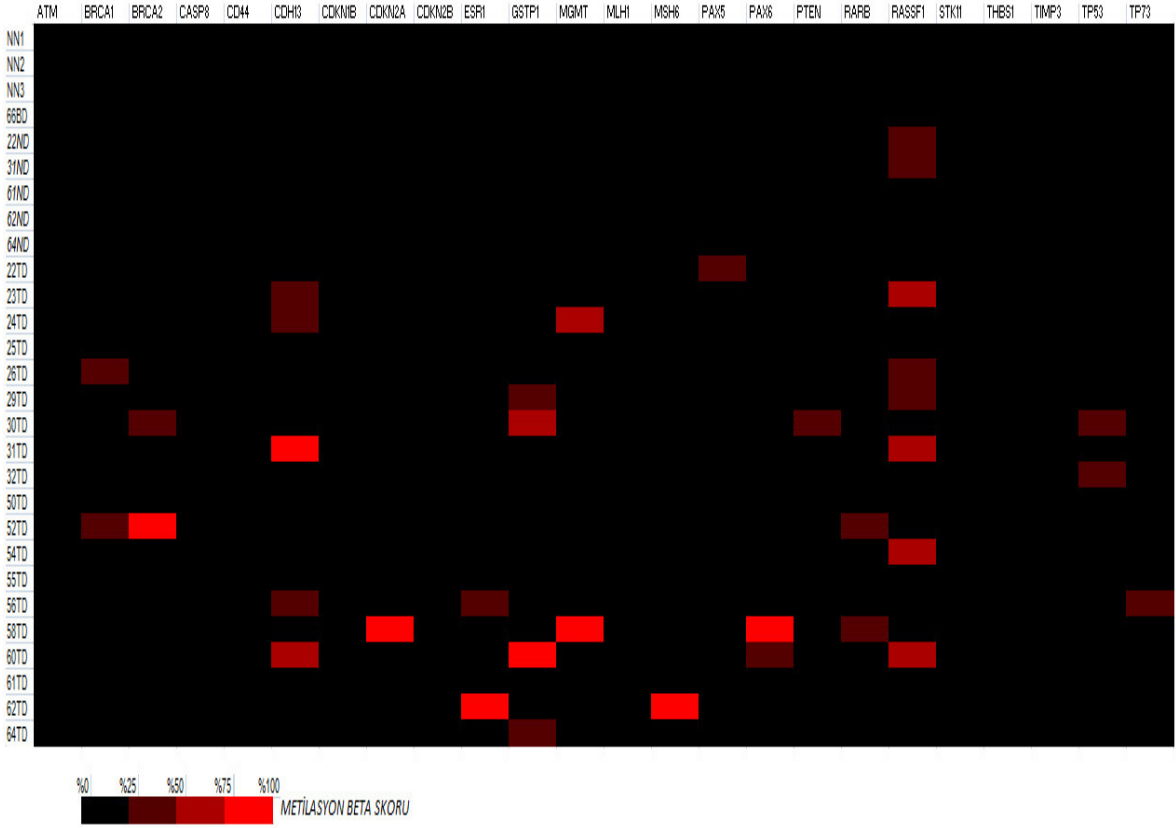
Tablo 22. Aynı gene ait birden fazla bölge çalışılan durumlarda metilasyon bulguları

	23TD	24TD	26TD	29TD	30TD	31TD	52TD	54TD	56TD	58TD	60TD	62TD	64TD	22ND	31ND
BRCA1	.	.	M -	.	.	.	M -
BRCA2	M -	.	M -
CDH13	M -	M M	.	.	.	M -	.	.	M -	.	M M
CDKN2A	M -
ESR1	M -	.	.	M -	.	.	.
GSTP1	.	.	.	M -	M -	M M	.	M -	.	.
MGMT	.	M -	M -
PTEN	M -
RARB	M -	.	.	M -
RASSF1	M M	.	M -	M -	.	M M	.	M M	.	.	M M	.	.	M -	M -
TP73	M -

MM: iki bölgede de metilasyon varlığı; M - : yalnızca bir bölgede metilasyon varlığı



Şekil 46. Hipermetilasyon durumunu gösteren sıcaklık haritası

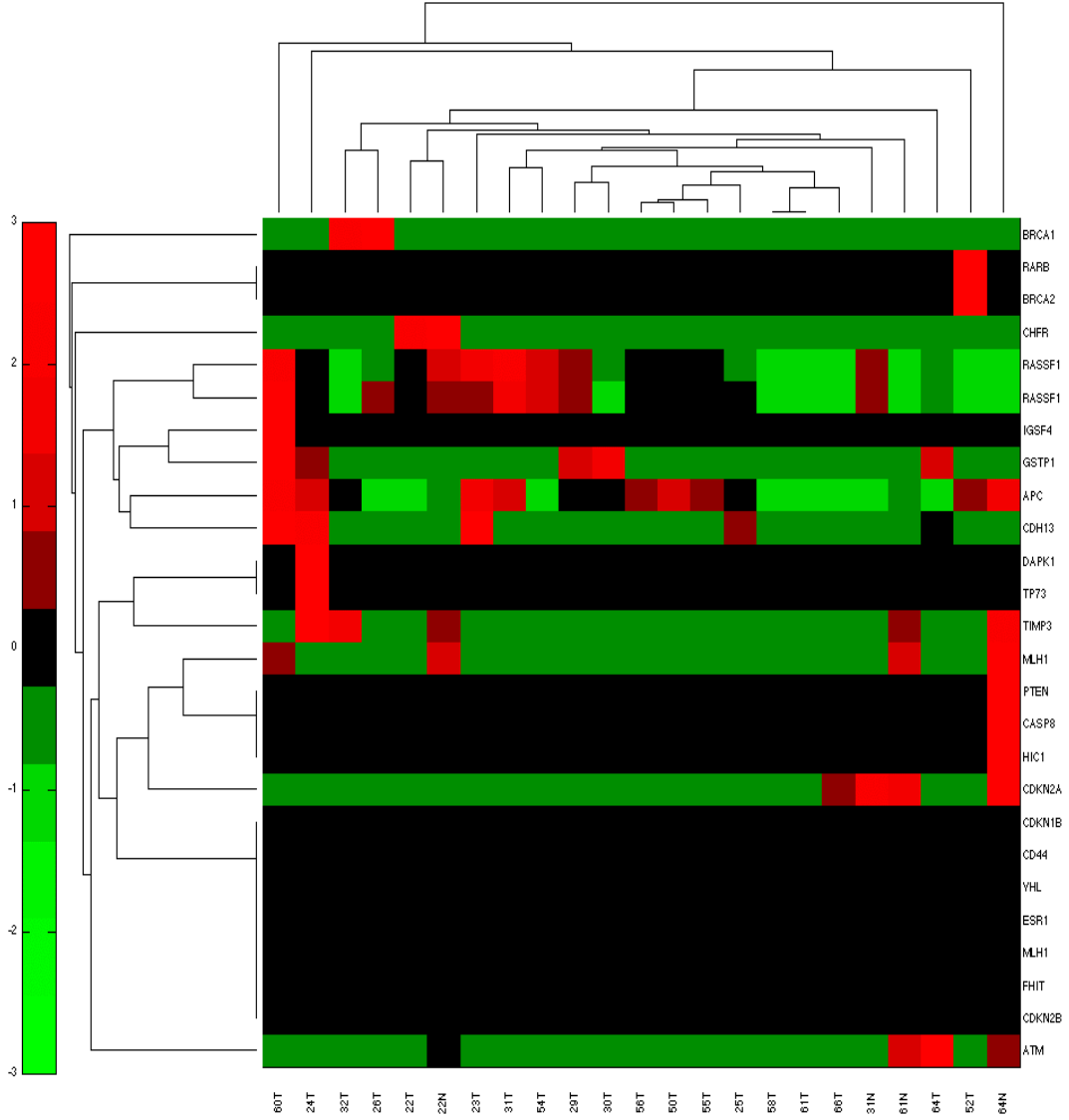


Şekil 47. Hipermetilasyon durumunu gösteren yarı kantitatif sıcaklık haritası

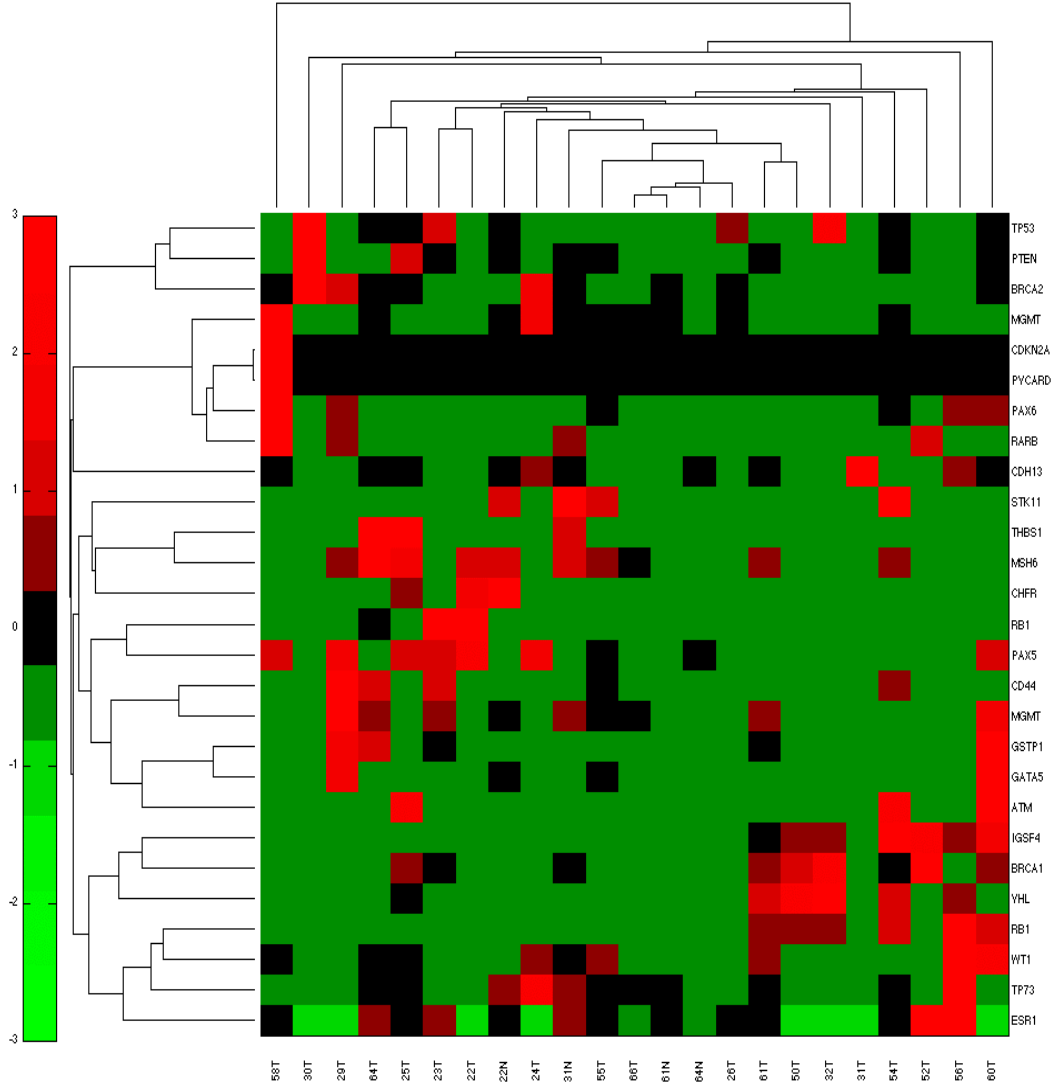
3.7. MLPA Verileri Arasında Korelasyonlar

Analizlere konu olan örnekler temel alınarak, her bir MLPA verisi için genlere ait değerlerin birbirleriyle daha kolay kıyaslanabilmeleri amacıyla genler arası ve örnekler arası korelasyon değerleri hesaplanarak her bir veri kümesi için dendogramlar oluşturulmuş ve ısı haritası (*heat map*) üzerinde gösterilmiştir (Şekil 48 ve 49).

Her gen için MLPA sonuçlarının birbiri ile korelasyonlarından (Bkz. Ek 22 ve 23) güçlü korelasyonlar ($r > 0,7$) Tablo 23'te gösterilmiştir. Tabloda yer alan değerler, korelasyon katsayısı (r) değerini göstermektedir. r değerinin 1'e yakın olması, ilişkinin kuvvetli olduğunun göstergesidir. Ayrıca tüm korelasyonlar ağ grafiği ile ifade edilmiştir (Şekil 50 ve 51). Şekillerde yalnızca istatistiksel açıdan zayıf olmayan gen ilişkileri gösterilmiştir.



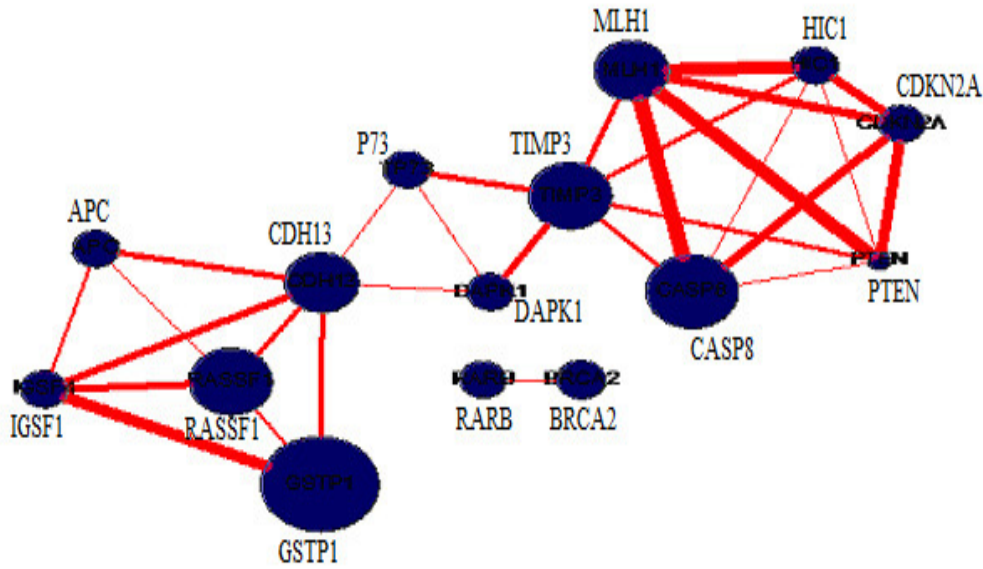
Şekil 48. ME001 MLPA verisinin dendogramı ve ısı haritası
 mMLPA beta skorları ile parametrik olmayan karşılaştırmalar yapılmıştır. Verinin medyanına denk gelen değerler siyah ile gösterilmiş olup, standart sapmaya göre renklendirme ölçütü sol taraftaki lejantta gösterilmiştir.



Şekil 49. ME002 MLPA verisinin dendogramı ve ısı haritası
 mMLPA beta skorları ile parametrik olmayan karşılaştırmalar yapılmıştır. Verinin medyanına denk gelen değerler siyah ile gösterilmiş olup, standart sapmaya göre renklendirme ölçütü sol taraftaki lejantta gösterilmiştir.

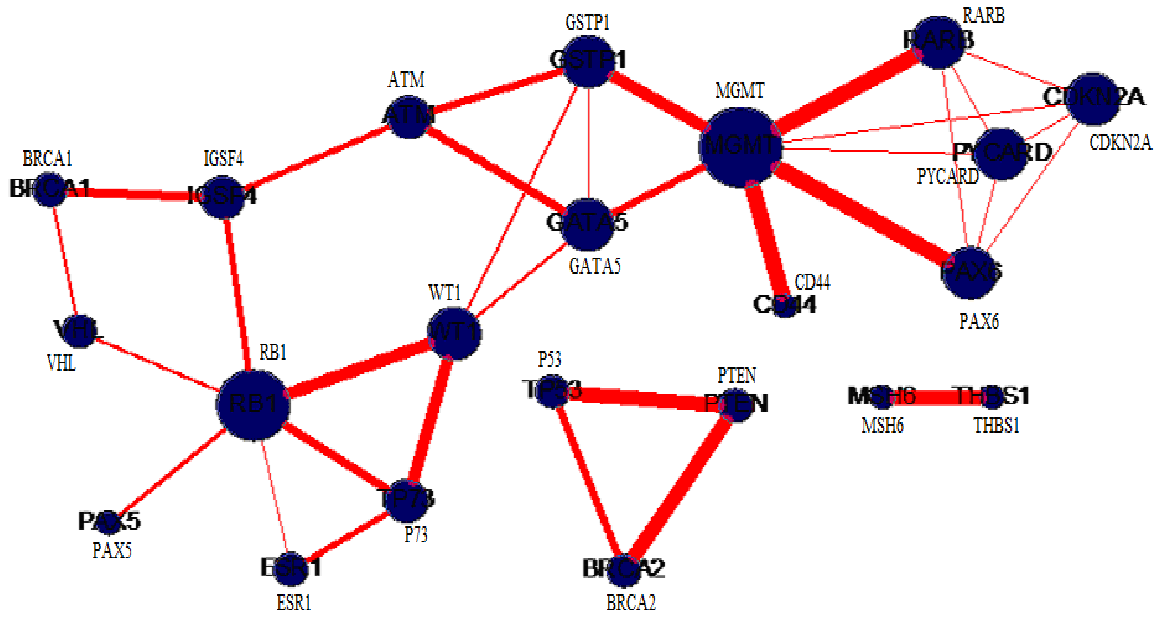
Tablo 23. Metilasyon durumları arasında güçlü korelasyon olan genler (r değerleri)

	BRCA2	CASP8	CD44	CDKN2A	GSTP1	MGMT	MLH1	MSH6	PAX6	PTEN	RARB	RASSF1	THBS1	TP53	TP73
BRCA2	0,8	1,0
CASP8	.	.	.	0,7	.	.	0,9	.	.	1,0
CD44	0,8
CDKN2A	.	0,7	.	.	.	0,9	0,7	.	1,0	0,7	0,9
GSTP1	0,7
MGMT	.	.	0,8	0,9	0,7	.	.	.	0,8	.	0,8
MLH1	.	0,9	.	0,7	0,9
MSH6	0,8	.	.
PAX6	.	.	.	1,0	.	0,8	0,9
PTEN	0,8	1,0	.	0,7	.	.	0,9	0,8	.
RARB	1,0	.	.	0,9	.	0,8	.	.	0,9
RASSF1	0,9	.	.	.
THBS1	0,8
TP53	0,8
TP73	0,9



Şekil 50. ME001 MLPA verileri korelasyon sonuçlarını gösteren gen ağı.

Her bir daire bir geni temsil etmektedir. Dairelerin büyüklüğü, diğer genlerle olan ilişkinin sayıca fazlalığına işaret etmektedir. Bağlantıların kalınlığı korelasyon katsayısının (r^2 'nin) kuvvetini simgelemektedir.



Şekil 51. ME002 MLPA verileri korelasyon sonuçlarını gösteren gen ağı. Her bir daire bir geni temsil etmektedir. Dairelerin büyüklüğü, diğer genlerle olan ilişkinin sayıca fazlalığına işaret etmektedir. Bağlantıların kalınlığı korelasyon katsayısının (r 'nin) kuvvetini simgelemektedir.

4. QRT-PCR VE MMLPA VERİLERİ İLE DEMOGRAFİK VERİLER ARASINDAKİ İLİŞKİLER

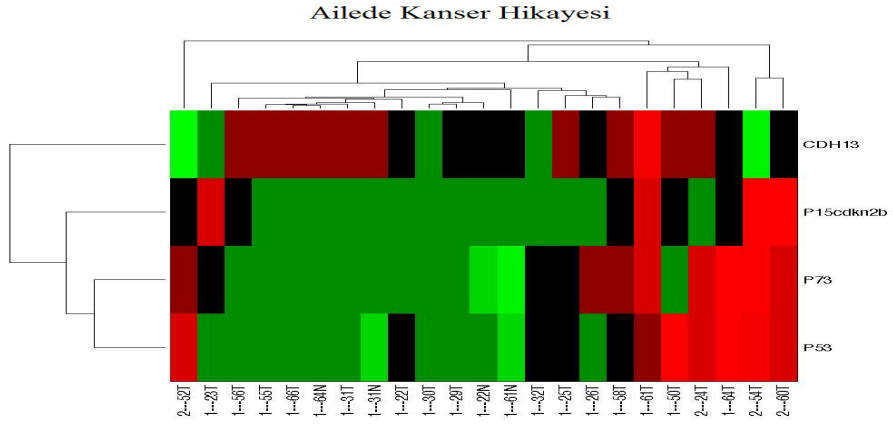
4.1. PCR Verileri ile Demografik Veriler Arasındaki İlişkiler

Demografik bilgiler doğrultusunda RT-PCR verileri ANOVA yöntemiyle analiz edilmesi sonucu elde edilen tüm p-değerleri (Bkz. Ek 24) arasından anlamlı ilişkilere dayandırılarak gerçekleştirilen multivaryat (çok değişkenli) karşılaştırma testleri sonuçları ise Tablo 24’te listelenmiştir.

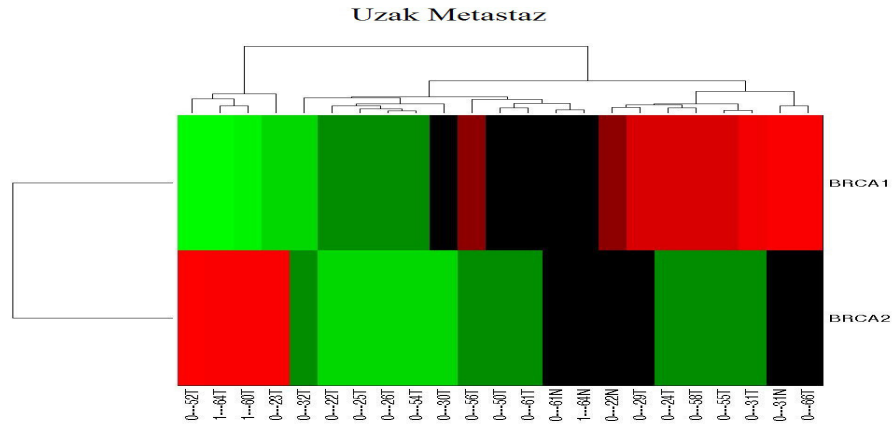
İstatistiksel açıdan anlamlı farklılıkların gözlemlendiği durumlara ilişkin çoklu karşılaştırma testlerine ait grafikler ile her bir durumda ilgili genlerin hangi grupları istatistiksel açıdan anlamlı olarak ayırabildiği ise ısı haritası ve dendogramlar ile ifade edilmiştir (Şekil 52).

Tablo 24. PCR verilerinde anlamlı derecede farklı gruplar ve p değerleri

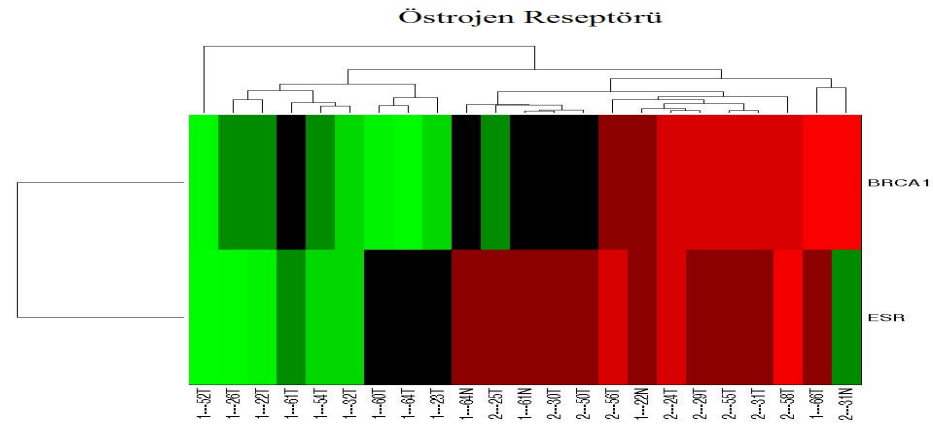
	BRCA1	BRCA2	CDKN2B	TP53	TP73	CDH13	PTEN	CD44	ESR1
Gebelik Sayısı	-	-	-	-	-	-	1-2 ,1-3 (<0,001)	-	-
Ailede Kanser Hikayesi	-	-	1-2 (0,004)	1-2 (0,006)	1-2 (0,010)	1-2 (0,010)	-	-	-
Histolojik Tip	-	-	-	-	-	-	-	-	1-3 (0,019)
Mitotik Aktivite	-	-	-	-	-	-	-	-	1-2 (0,046)
Uzak Metastaz	1-2 (0,033)	1-2 (0,016)	-	-	-	-	-	1-2 (0,033)	-
Östrojen Reseptörü	1-2 (0,007)	-	-	-	-	-	-	1-2 (0,006)	1-2 (0,004)
HER2 Reseptörü	-	1-2 (<0,001)	-	-	-	-	-	1-2 (0,033)	-



A)



B)



C)

Şekil 52. PCR Verilerinde multivaryat karşılaştırma sonuçları ve dendrogramlar
A)Ailede Kanser Hikayesi; B)Uzak Metastaz ve C)Östrojen Reseptörü ile Gen Ekspresyonunun ilişkisi

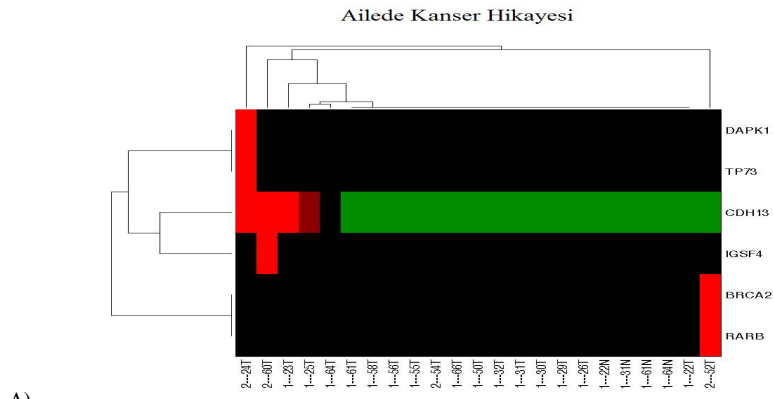
4.2. MLPA Verileri ile Demografik Veriler Arasındaki İlişkiler

Demografik bilgiler doğrultusunda Metilasyon MLPA verilerinin ANOVA yöntemiyle analiz edilmesi sonucu elde edilen tüm p değerleri (Bkz. Ek 25 ve 26) arasından anlamlı olanlara dayandırılarak gerçekleştirilen multivaryat karşılaştırma testleri sonuçları ise ANOVA sonucu p değerleri ile birlikte Tablo 25’te listelenmiştir. Tabloda her iki test ile alınan sonuçlar “veya” işlemcisi ile birleştirilerek gösterilmiştir.

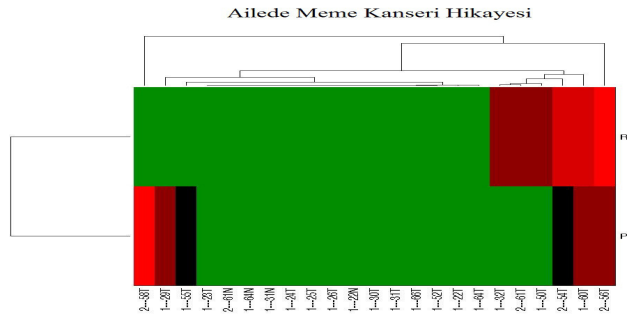
İstatistiksel açıdan anlamlı farklılıkların gözlemlendiği durumlara ilişkin çoklu karşılaştırma testlerine ait grafikler ile her bir durumda ilgili genlerin hangi grupları istatistiksel açıdan anlamlı olarak ayırabildiği ise ısı haritası ve dendrogramlar ile ifade edilmiştir (Şekil 53).

Tablo 25. Metilasyon durumları farklı olan gruplar

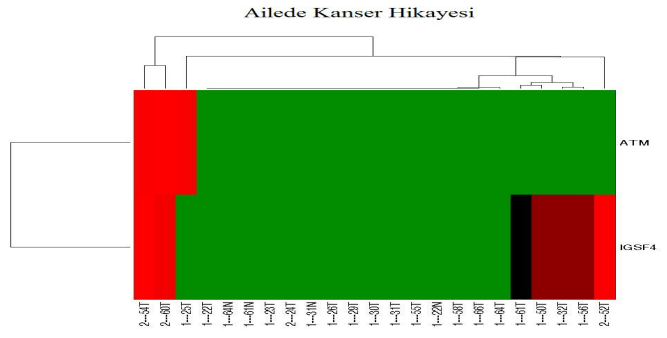
	ATM	BRCA1	BRCA2	CASP8	CDH13	ESR1	GSTP1	MGMT	MLH1	PAX5	PAX6	PTEN	RARB	TIMP3	TP53	TP73
Menarş yaşı	1-2	-	-	-	-	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	1-2	1-2
															1-3	1-3
Menapoz durumu	-	-	-	-	-	-	-	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-
Gebelik Sayısı	-	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ailede Kanser Hikayesi	1-2	-	1-2	-	1-2	-	-	-	-	-	1-2	-	1-2	-	-	1-2
Evre	2-4	-	-	-	-	-	2-4	-	2-4	-	-	-	-	-	-	-
	3-4						3-4		3-4							
Uzak Metastaz	1-2	-	-	1-2	-	-	1-2	-	1-2	-	-	1-2	-	-	-	-
HER2 Reseptörü	-	-	-	-	-	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histolojik Tip	-	-	1-3	-	-	-	-	-	-	1-2	-	-	-	-	-	-
										4-2						
Östrojen Reseptörü	-	-	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nükleer Grade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1-2	-	-	-	-	-
											1-3					



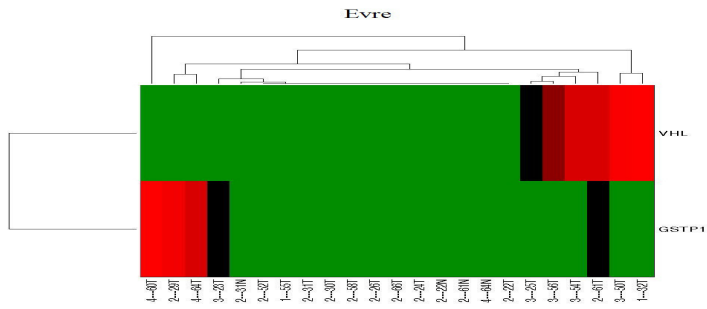
A)



B)



C)



D)

Şekil 53. mMLPA-ME001 multivaryat analiz sonuçları ve dendrogramlar A,B,C)Ailede Kanser Hikayesi ve D)Evre ile hipermetilasyonun ilişkisi

5. GERÇEK ZAMANLI PCR VE METİLYASYON MLPA ARASINDAKİ İLİŞKİLER

5.1. Metilasyon durumunun ekspresyon durumu ile ilişkisi

Gerçek zamanlı kantitatif PCR ve metilasyon MLPA çalışmalarında ortak olan 23 gen için hipermetilasyon varlığının gen ekspresyon değişiklikleri ile ilişkisi Tablo 26'da gösterilmiştir. Hiçbir hastada metilasyon saptanmayan genler ve hiçbir gende metilasyon saptanmayan hastalar gösterilmemiştir. Aynı tabloda ayrıca hipermetilasyon varlığında gen ekspresyonunda azalma olup olmamasının ne derecede anlamlı olduğu p kolonunda verilmiştir. p değerinin 0,05'ten küçük olması, istatistiksel olarak anlamlı durumları göstermektedir.

Tablo 26. Hipermetilasyon varlığında ilgili genin ekspresyonu durumları

p	22TD	23TD	24TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	52TD	54TD	56TD	58TD	60TD	62TD	64TD	22ND	31ND
BRCA1				-					-								
BRCA2						-			+								
CDH13		-	+				-				o		-				
CDKN2A												+					
ESR1											+				-		
GSTP1						-	-						+			+	
MGMT				-								+					
MSH6															-		
PAX5	+																
PAX6												+	+				
PTEN							-										
RARB										-		+					
RASSF1		-				-	-				-			o			-
TP53							+										
TP73									+								

Artı (+) artmış ekspresyonu, eksi (-) azalmış ekspresyonu, nokta (o) değişmemiş ekspresyonu göstermektedir. Boş hücreler metilasyon gözlenmeyen koşullardır. p değeri ise hipermetilasyon ile gen ekspresyonundaki azalmanın ilişkisinin ne kadar anlamlı olduğunu göstermektedir.

5.2. Ekspresyon durumunun metilasyon durumu ile ilişkisi

Gerçek zamanlı kantitatif PCR ve Metilasyon MLPA çalışmalarında ortak olan 23 gen için gen ekspresyon değişikliklerinin hipermetilasyon varlığı ile ilişkisi Tablo 27 ve 28’de gösterilmiştir. Gen ekspresyonunda değişiklik olmayan hastalar ve genler gösterilmemiştir. Gen ekspresyonu değişiklikleri ile hipermetilasyon varlığının ne derecede anlamlı olduğu ise p kolonunda verilmiştir. p değerinin 0,05’ten küçük olması, istatistiksel olarak anlamlı durumları göstermektedir.

Tablo 27. Gen ekspresyonunun azalmış olduğu koşullarda hipermetilasyon durumu

p	22TD	23TD	24TD	25TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	50TD	52TD	54TD	55TD	56TD	58TD	60TD	61TD	62TD	64TD	22ND	31ND	61ND	62ND	64ND
ATM						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRCA1	0	0	0	0	M	0	0	0	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRCA2	0	0	0	0	0	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CASP8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD44						0	0																	
CDH13	0	M	0	0	0	0	0	M	0	0	0	0	0	0	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CDKN2A																								
CDKN2B																								
ESR1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	M	0	0	0	0	0	0
GSTP1						M	M						0											
MGMT	0	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MLH1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MSH6										0	0	0	0	0	0	0	0	M	0	0	0	0	0	0
PAX5																								
PAX6																								
PTEN	0	0	0	0	0	0	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RARB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RASSF1	0	M	0	M	M	0	0	M	0	0	0	M	0	0	0	0	0	0	0	0	M	0	0	0
STK11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
THBS1						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TIMP3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TP53																								
TP73																								

M simgesi (M) metilasyon varlığını, nokta (o) ise metilasyon gözlenmediğini simgelenmektedir. p değerinin 0,05'ten küçük olması, gen ekspresyonundaki azalmanın metilasyon varlığı ile ilişkilendirilebileceğini göstermektedir.

Tablo 28. Gen ekspresyonunun artmış olduğu koşullarda hipermetilasyon durumu

	p	22TD	23TD	24TD	25TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	50TD	52TD	54TD	55TD	56TD	58TD	60TD	61TD	62TD	64TD	66BD	3IND	62ND	64ND	
ATM		0	0	0	0	0								0				0						0	
BRCA2		0									M						0			0				0	
CASP8		0			0									0					0						
CD44		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CDH13			M	0										0					0					0	
CDKN2A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CDKN2B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESR			0								0			M	0										
GSTP1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	M	0	0	M	0	0	0	0	0
MGMT		0			0						0	0	0	0	0	M	0	0							
MLH1							0				0	0	0	0	0	0									
MSH6		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAX5		M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAX6		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	M	0	M	0	0	0	0	0	0
PTEN														0											
RARB									0					0	0	0	M	0							
RASSF1										0				0	0	0			0						
STK11		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
THBS1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TIMP3														0											0
TP53		0	0	0	0	0	0	0	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TP73		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

M simgesi (M) metilasyon varlığını, nokta (o) ise metilasyon gözlenmediğini simgelemektedir. p değerinin 0,05'ten küçük olması, gen ekspresyonundaki artışın metilasyon yokluğu ile ilişkilendirilebileceğini göstermektedir.

V. TARTIŞMA

1. ANALİZ TEKNİKLERİNE YAKLAŞIM

Bu çalışma ile diğer kanserlerde olduğu gibi meme kanserinde de halen geçerli olan histopatolojik yaklaşım ile evrelendirmeye ve sınıflandırmaya genetik temelli bir bakış açısı getirmeyi planlamıştık. Meme kanserinde de diğer bir çok kanser gibi tam kanser gelişmeden önce hedef hücrede bir çok epigenetik ve genetik bir çok olay gelişmelidir [11,21,376]. Öyleyse meme kanseri ile ilişkisi gösterilen bazı tümör süpresör genlerin ekspresyon düzeyleri ve metilasyon durumları ile hastalığın kliniğe yansımaları arasında bir ilişki olabileceğini düşündük. Bu doğrultuda, tümör biyobankasından elde edilen örneklerde gen ekspresyon düzeylerini incelemek için bir dizi qRT-PCR ve o genlerin promotor bölgelerindeki metilasyon durumlarını incelemek için de mMLPA testleri gerçekleştirdik.

1.1. Gerçek zamanlı RT-PCR ile Kantitasyon

Kantitatif PCR meme kanseri araştırmalarında sıklıkla kullanılan değerli bir tekniktir [350-354]. Standart eğriyi kullanan absolut kantitasyon zaman alıcı ve zahmetliyen incelenen genin metabolik olaylar, hormonlar, hücre siklusu gibi hücre sel varyasyonlardan etkilenmeyen genin/genlerin mRNA miktarına direk olarak oranlanması daha kolay ve daha kesindir. Rölatif kantitasyon olarak bilinen bu yöntemin güvenilirliğini etkileyen en önemli faktör verilerin normalizasyonunda izlenen yoldur [367,369,370]. Normalizasyonda günümüzde geçerli olan yöntem referans genlerin kullanılmasıdır [431]. Teorik olarak referans olarak kullanılan genler *in vivo* ve *in vitro* deney koşullarından etkilenmeden eksprese edilmelidir. Bununla birlikte yapılan çalışmalar referans olarak önerilen genlerin bir kısmının ekspresyonunun differansiyasyon, kanser progresyonu, hormonal metabolizma gibi durumlarda değiştiğini göstermiştir [432,433]. Bu nedenle de her bir deney kurgulanırken uygun referans genleri tanımlamak gereklidir. Bu, özellikle biyolojik örnekler ile gerçekleştirilen gen profili ve alt grup analizlerinde küçük farklılıklar araştırıldığında

önemlidir. Reaksiyonlarda kullanılan enzim verimliliklerindeki değişikliklere, RNA miktarındaki ve kalitesindeki farklılıklara olan duyarlılığı azaltmak için bir referans geninden daha fazla genin kullanılması yaygın olarak kabul edilen bir uygulamadır [433,434]. Meme kanserinin heterojenitesi uygun referans genin test edilmesini zorunlu kılar. Az sayıdaki örneklerle yapılan bir çalışmada normal meme dokusu ve meme tümöründeki veri normalizasyonunda TBP (*Tata binding protein*), RPLP0 (*Ribosomal protein large P0*) ve PUM1 (*Drosophila pumilia homolog 1*) kullanılması önerilmekle birlikte [435], 99 örnekle gerçekleştirilen bizim bir çalışmamızda, tümör, tümör çevre dokusu ve normal dokunun birlikte değerlendirildiği durumlarda PUM1 ve RPL13A (*Ribosomal protein 13A*) genlerinin kullanılabilirliği gösterilmiştir [436]. Yapılan analize çevre normal dokusu dahil edilmediğinde PUM1 geninin B2M (*Beta 2 microglobulin*) ile birlikte normalizasyonda kullanılabilirliğini gösteren veriler, deneyin kurgulanırken araştırmaya dahil edilen dokuların niteliğine göre referans genlerin seçilmesi ve stabilitesinin test edilmesi gerekliliğini ortaya koyar. Biz de bu deneyde tüm örnekler için en stabil genler olan PUM1 ve RPL13A çiftini kullandık.

Gerçek zamanlı PCR deneylerinin birçoğu standart eğri tasarısını içermez ve de amplifikasyon verimliliğini tahmin eden yöntemi kullanmaz. Biz, gerçek zamanlı PCR'ın verimliliğinin oran tahmininde anlamlı bir etkisi olduğundan, uygun kalite kontroller olmaksızın gerçek zamanlı PCR verilerinin güvenilir olmayacağını düşünüyoruz. Örneğin, reaksiyon %80 amplifikasyon verimliliğine sahipse (PCR ürünü, döngü başına iki katı yerine $2^{0.8}$ katı artacaktır), sadece 3 ΔCt değeri, oranda 8 kat yerine 5.27 kat farklılığa denk gelecektir. Bu problem $\Delta\Delta Ct$ ya da ΔCt değerlerinde katlanarak büyür ve yorumlarda şiddetli yanlışlıklara neden olabilir. Bu nedenle insan doku havuzundan elde edilmiş evrensel (*universal*) referans RNA'dan çevrilmiş cDNA örneğinin seri dilüsyonları ile her bir genin amplifikasyon verimliliğini belirleyerek verilerin daha güvenilir karşılaştırılmasını sağladığımızı düşünüyoruz.

1.2. Gerçek zamanlı PCR'da kalitatif değerlendirme

Kantitatif olmayan metilasyon durumlarının ekspresyon ile ilişkisini değerlendirme aşamasında kantitatif olmayan ekspresyon değerleri kullanıldı. Burada normalize skorlar,

“azalmış ekspresyon”, “artmış ekspresyon” ve “değişiklik yok” olmak üzere 3 kategoriye ayrıldı. Bu kategoriler yapılırken eşik değeri olarak $p=0,05$ güvenlik aralığına denk gelen 1,5 kat kullanıldı [419-421]. Bu konuda yazarlar farklı eşik değerleri kabul etmişlerdi [420,421,437-440]. Bizim çalışmamızda duplike örnekler arasında 1.0 Ct den az farkların ortalaması alınmaktaydı. Ayrıca plaklar arası varyasyon da kontrol edilmekteydi ve 0,05’den fazla sapma olmasına izin verilmemekteydi. Böylece durumda deneysel hataların sonucu değiştirerek yalancı pozitifliğe sebep verme olasılığı azaldı.

1.3. MLPA da yanlış pozitifliğin değerlendirilmesi

Ekspresyon düzeyleri belirlenen genlerin promotor bölgelerindeki metilasyon durumlarının incelenmesi için nispeten yeni ancak multipleks çalışma imkanı verdiği için hızlı ve kullanışlı bir teknik olan metilasyon MLPA tercih edildi [374]. MLPA tekniği, kendi reaksiyon dinamiği açısından ortamdaki varyasyonlara çok duyarlı bir teknik olduğu için sonuçların değerlendirilmesinde bir takım normalizasyonlar gerekli olmaktadır. Yazarların nadiren söz ettiği bu hesaplamaların [422] test sonuçlarını bir miktar değiştirebilmesi olası olup, son zamanlarda normalizasyon aşaması için de farklı öneriler yapılmaktadır [441]. Bizim çalışmamızda uyguladığımız multipleks PCR’ı oluşturan her bir bileşenin reaksiyon verimliliklerinin farklı olması, kapiller elektroforezde büyük fragmanlara ait piklerin dağılması ve PCR sırasında küçük fragmanların büyüklere kıyasla daha etkin amplifiye olması durumlarından kaynaklanabilecek değerlendirme hatalarını azaltan yöntemin de tekniği ilk öneren ekip ile çok benzer olduğunu gördük [422,423]. Metilasyon MLPA sonuçları için farklı yazarlar tarafından kantitatif, yarı kantitatif ve kalitatif değerlendirmelerin önerilmekteydi [442-444]. Normalize edilmiş MLPA sonuçlarının sürekli formdaki değerlerinin kalitatif hale dönüştürülmesi için kabul edilen eşik değeri hakkında da farklı uygulamalar vardı [423,442-445]. Biz, MLPA tekniğini geliştiren ve bu konudaki ilk yayını [380] yapan ekibin önerileri ve mMLPA sonuçlarında yanlış pozitifliği değerlendiren çalışmalar doğrultusunda, kantitatif olmayan ve eşik değerini %25 kabul eden bir hesaplama ile elde edilen sonuçları “metilasyon var” ve “metilasyon yok” olarak iki gruba ayırdık ve istatistiksel değerlendirmelere bu şekilde devam ettik [380,445].

2.GEN EKSPRESYONU DEĞİŞİKLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hastalara ait tümör örneklerinin tamamında en az dört tümör süpresör genin ekspresyonunda 1,5 kat ve fazla azalma gözlenirken, sağlıklı normal hastaların hiç birinde hiç bir gen için ekspresyon azalması yoktu. Benzer şekilde hastaların tamamında en az iki gende ekspresyon artışı vardı. Sağlıklı normal bireylerde ise ekspresyon düzeylerinde değişiklik 1-1,5 kat sınırları dahilindeydi. Normalize değerler hesaplanırken ikinci basamakta sağlıklı normal dokuların ortalamasına oranlandığı için normal dokularda ekspresyon değerlerinin 1,0'a yakın olması beklenmekteydi. Ancak incelenen 23 genin tamamı için ve tüm sağlıklı hasta örneklerinde değişiklikler 1,5 kat altı oranlarda gözlemlendiğinden, belirgin ekspresyon değişikliklerinin anlamlı olduğu düşünüldü. Ayrıca hasta başına ortalama %38 gende azalma ve %47 gende artış şeklinde göze çarpan ve incelenen genlerin en azından 17'sinde mevcut ve ortalama 17,1 kat olan ekspresyon (tümör dokularda) değişikliklerin bazı hastalarda yüzlerce kata kadar çıkması da bu düşünceyi destekledi.

Hastalara ait tümör komşusu normal dokularının tamamında daha çok azalma lehine olan belirgin ekspresyon değişiklikleri gözlemlendi. Bu, tümörleşmiş dokuda olduğu kadar kanserogenez sırasında da dokularda genetik ekspresyon açısından önemli farklılıklar olduğu yönüne bir bulguydu. Ayrıca çalışmaya dahil edilen bir benign tümör örneğinde, yalnızca 3 gen için artış yönünde değişikliğin gözlenmemesi, yani dokunun tümör süpresör ekspresyon profilinin sağlıklı normal meme dokusundan istatistiksel olarak farklı olmaması, söz konusu genlerin beklendiği üzere, daha çok malign transformasyon sırasında etkili olabileceğini düşündürmektedir. Komşu normal dokular ile ilgili bir başka husus ise, gen ekspresyon değişikliklerinin artıştan çok, azalma lehine (dokuların tamamında en az bir genin ekspresyon düzeyinde azalma varken, ancak %60'ında artış gözlemlendi). Zaten incelenen genler tümör süpresör genler oldukları için, daha çok ekspresyon azalmasının gözlenmesi beklenmekteydi. Oysa ki, tümör örneklerinde incelenen genlerin hem artış hem de azalış yönüne oldukları görüldü. Bu, kansere dönüşümün ilk dönemlerinde tümör süpresör genlerin fonksiyonlarının daha çok azaldığını, daha ileri safhalarda ise ilişkilerin çok daha kompleks bir yapı halini aldığını düşündürdü. Ayrıca komşu normal dokularda tümöre oranla daha fazla gende ekspresyon azalması gözlenirken (15,4/23'e karşılık 8,85/23), daha az gende ekspresyon artışı

(3,60'e karşılık 10,75) gözlenmesi de bu düşüncüyü destekler yöneydi.

Komşu normal dokularda ekspresyon azalması yönüne değişiklikler, tümör dokularına oranla daha çok dağılmıştı (sırasıyla $\sigma=6,5$ ve $4,38$). Şöyle ki bazı komşu normal dokular ekspresyon profili olarak sağlıklı dokulara yakınken, bazı dokular ise tümör dokularına yakın profil sergilemekteydi. Bu da kanser oluşumunda yönlendirici mekanizmaların hastadan hastaya farklılık gösterdiğini düşündürdü.

Ancak istatistiksel olarak anlamlı ve güçlü sonuçlar elde edilse dahi, tüm bu düşünceler bağlamında net bir karar verebilmek ancak daha büyük hasta grupları ile yapılan çalışmalar ile mümkün olabilecektir.

Ekspresyon değişiklikleri gen düzeyinde incelendiğinde, tümör dokularda BRCA1, TIMP3, BRCA2, ESR1, PTEN, RARB, ATM, CDH13, RASSF1 ve CASP8 genleri için ekspresyon düzeyleri, incelenen dokuların en az yarısında azalmıştı. Tümör süpresör genlerden BRCA1 geninin ekspresyonunun hemen hemen tüm tümör dokularında (%90) azalmış olduğu gözlenirken, TIMP3, BRCA2 ve ESR1 için de bu oran %70 ve üzerindedi.

Tümör dokularda CDKN2A, PAX5, TP53, TP37, PAX6, CD44, GSTP1, THBS1 ve STK11 genleri ise hastaların en az yarısında artmış ekspresyon düzeylerine sahipti. Bunlardan CDKN2A ve PAX5, hemen hemen tüm hastalarda (sırasıyla %95 ve %90) artmış düzeylerdeyken, TP53, TP73, PAX6, CD44, CDKN2B ve GSTP1 için ise bu oran %70 ve üzerindedi. MLH1 geni ise daha sık azalış yönünde değişikliklere sahip olmasına rağmen, hastaların yarısından fazlasında değişmemiş veya artmıştı.

Ekspresyon değişikliği miktarlarına bakıldığında ise en uç azalış ve artışların gözleendiği genler sırasıyla ESR1(481 kat) ve TP53(172 kat) idi.

Gen ekspresyon paternleri karşılaştırıldığında, bazı tümör süpresör genlerin birbiri ile ilişkili olduğu gözlendi. ATM, CASP8 ve MLH1 genlerinde gözlenen değişiklik paternlerinin benzer olduğu görüldü (ikili olarak sırasıyla $r=0,78$; $0,88$ ve $0,75$).

RASSF1 ile TIMP3 ve RASSF1 ile ATM arasında ilişki güçlü korelasyonlar vardı ($r=0,74$ ve $r=0,71$). RASFF1 azalışının genellikle TIMP3 ve ATM azalışı ile birlikte olduğu gözlendi. RARB ile CASP8 genlerinde görülen değişiklikler de birbiri ile ilişkili idi ($r=0,72$).

Sıklıkla artış yönünde değişiklik gösteren TP73 ile TP53 arasında da güçlü ilişki mevcuttu ($0,77$). Benzer bulgular daha önce farklı kanser tiplerinde de gösterilmişti [460].

Tümör süpresör genler olarak inaktivasyonlarının tümör oluşumuna yönelime sebep olmasının yanı sıra, tümördeki artmış ekspresyon seviyeleri genellikle agresif özellikler ile birliktelik göstermektedir [461,462].

Diğer taraftan ESR1 ile CDH13 ve TIMP3 arasında orta derecede güçlü ancak istatistiksel olarak anlamlı ilişkiler mevcuttu ($p < 0.001$). Ayrıca diğer ilişkilerden farklı olarak CDH13 ile CD44 arasında güçlü ve ters bir orantı bulundu ($r = -0,71$). Yani CDH13 ekspresyon düzeyleri azalış gösterdiğinde, CD44 artmaktaydı.

Komşu normal dokular değerlendirildiğinde ise, gen düzeylerinin sıklıkla değişmediği gözlemlendi. Ancak değişiklikler görülen hastalarda ise, tümör dokuda en sık artış gösteren CDKN2A ve PAX5 genlerinin yine daha sık artış gösterdiği; CD44 hariç diğer tüm genlerin ise sıklıkla azalış gösterdiği görüldü. Komşu dokuda CD44 genindeki değişiklikler ise ne artış ne de azalış lehine idi. CDKN2A ekspresyon artışının dokulardaki yaşlanma ile birlikteliği de gösterilmişti [162,163]. Çalışmaya katılan örnek sayısı genelleme yapmak için az olmakla birlikte, tümör süpresör olarak değerlendirilen CDKN2A ve PAX5 genlerindeki ekspresyon artışının tümörigenezin başlamasının yanı sıra, ilerlemesi yönünde de etkili olduğunu düşündürmektedir [236].

Çalışmaya dahil edilen bir adet benign tümör dokusu ise genellikle normal dokuya yakın ekspresyon düzeyleri sergilemekle birlikte, CDKN2B ve ESR1 düzeylerinde kabul edilen eşik değerinin hemen üzerinde olan (1,5 kat) düzeyinde sırasıyla artış ve azalış sergilemekteydi. Bu dokuda ayrıca GSTP1 düzeyi de bir miktar artmıştı (2 kat). Komşu normal dokularda ekspresyon profilinin sağlıklı normal dokulardan farklılık göstermesi, kronik hastalığa olan cevap ile ilişkilendirilebileceği gibi, tümörigenezin tek noktada lokalize olarak oluşumundan ziyade daha geniş bir alanda başlayan pretümör oluşumlar zemininde tümöre dönüşmesini de düşündürmektedir.

3. METİLASYON DURUMLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Hastaların %95'inde en az bir tümör süpresör gen bölgesinde hipermetilasyon gözlenirken, sağlıklı normal hastaların hiç birinde, hiç bir gen bölgesinde metilasyon yoktu. Komşu dokuların ise %60'ında en az bir gen metile halde saptandı. Promotor bölgesi hipermetilasyonlarının sağlıklı dokudan tümörleşmeye doğru bir rol oynadığı bilinmekteydi. Bizim bulgularımız da bunu destekler yöndeydi. Komşu normal dokularda, tümör dokulara oranla az sayıda da olsa (hasta başına ortalama 0,2/23'e karşılık 3,3/23) bazı gen bölgelerinde metilasyon saptandı. Bu da epigenetik susturulma mekanizmasının kanser oluşumunun çevre dokuları da etkilediği; veya kanser oluşumunda çevre dokuların katkısı olduğu veya tümörleşmenin daha yaygın bir alanda bir zemin üzerinde aşama aşama gelişerek sonunda bir eşiği geçerek noktasal hale geldiği anlamına gelebilir. Belki de bu hipotezlerin tamamı bir arada etki etmektedir. Diğer taraftan komşu normal dokuların "normal" olarak isimlendirilmesinin sebebi histopatolojik bulgularının tümör özelliği göstermemesidir. Öyleyse bir olasılık da erken safha tümör davranışlarını cerrahi ve mikroskopik bulguların tanımlamaya yetersiz kalması olabilir.

Genler ile ilişkili promotor bölgelerin bazıları için birden fazla prop çifti tasarlanmıştı. Bu sayede bazı genler için aynı, bazı genler için farklı çalışmalarda olmak üzere, bir gene ait iki farklı metillenme bölgesi incelenebildi. Böyle durumlarda, hipermetilasyon saptanan genlerin çoğunun (%77) yalnız bir bölgesinin metilenmiş durumda olduğunu gördük. Ve metilasyon varlığı gözlenen genlerin arasında sadece RASSF1 için her iki bölgedeki durumun tutarlı olduğunu gördük ($r=0,9$). Yani RASSF1 hipermetilasyon ile susturulacaksa, bu genellikle promotor bölge boyunca daha yaygın bir metilasyon paterni ile olmaktadır. Ancak testin sınırlılıkları sebebiyle (sadece yaklaşık 30 baz uzunluğunda 2 bölgenin değerlendirilmesi) bu durumu RASSF1 için özelleştirmek doğru olmayabilir. Olası metillenme bölgesinin genişliği [446] ve metilasyon varlığının gözlendiği üzere tüm bölge üzerinde yaygın olmaması sebebiyle metilasyon varlığı araştırılırken tüm bölgenin taranması belki de daha doğru olacaktır.

Hem hasta hem de komşu normal dokularda hipermetilasyonun en yaygın olarak gözleendiği gen RASSF1'di (sırasıyla %32, %40). Hatta komşu normal dokularda 23 gen içerisinde sadece RASSF1 anlamlı derecede metileydi.

Tümör dokularında RASSF1 geninin ardından en sık metile olan genler CDH13 ve GSTP1'di (sırasıyla %26 ve %21). RASSF1, meme kanseri ile ilgili epigenetik çalışmalarda en sık olarak metile olduğu gösterilen genlerdendir [425,463-467]. RASSF1 geni duktal meme tümörlerinde %56-%70 oranında metile halde saptanmıştır [425,466-469]. GSTP1'de de önceli çalışmalarda %30-36 civarında metilasyon saptanmıştı [425,470] ve CDH13 da diğer bazı çalışmalarda daha nadir metile halde gözlenmişti [425,471]. Bu farklılıkların sebebi olarak, meme kanseri fenotipinin heterojen ve kompleks yapısı ile birlikte kullanılan tekniklerin arasındaki farklar olduğu düşünöldü ve bulgularımızın diğer çalışmalarla tutarlı olduğu kabul edildi. Evrelendirme ile metilasyon düzeylerinin ilişkilendirilmesinde, bu farkların açıklayıcı olabileceğine inanılmaktadır.

BRCA1, BRCA2, ESR1, MGMT, PAX6, RARB ve TP53 genleri promotor bölgelerinde %11; CDKN2A, MSH6, PAX5, PTEN ve TP73 bölgelerinde ise %5 sıklıkla metilasyon saptanırken; ATM, CASP8, CD44, CDKN2B, MLH1, STK11, THBS1, TIMP3 bölgeleri için hiçbir hastada metilasyon gözlenmedi. Tüm bu genler için farklı çalışmalarda ve farklı dokularda değişken sıklıklarda metilasyon gözlenmişti.

İncelenen genlerin metilasyon durumları arasında kompleks ilişkiler gözleendi. Genellikle basit ilişkiler ile açıklaması mümkün olmayan ancak istatistiksel olarak güçlü ($r>0,7$) 19 adet korelasyon mevcuttu. Bulunan ilişkilerin fonksiyonel olarak ifade edilmesi her bir alt gruptaki sayının azlığı sebebiyle yanıltıcı olabileceğinden değerlendirilmedi. Ancak bunlardan RARB ve BRCA2 arasında, MSH6 ile THBS1 arasında ve BRCA2 ile PTEN arasında daha sade ilişkiler gözleendi. MSH6 ve THBS1 arasında mesane kanserinde progresyonu tahmine yönelik ilişkiler gösterilmişti [472]. Diğer genlerin metilasyon durumları arasında veya meme kanserinde benzer ilişkiler daha önce gözlenmemişti. Bu korelasyonlar, kompleks mekanizmalar ile oluşan ve ilerleyen kanseri açıklamak için çok az sayıda veriye sahip olduğu için detaylı olarak incelenmedi.

4. EKSPRESYON DEĞİŞİKLİKLERİNİN METİLYASYON İLE İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Promotor metilasyonlarının gen ekspresyonunda azalmaya sebep olduğu bilinmektedir. Bizim çalışmamızda gözlenen bazı genlerin ekspresyonlarındaki azalmanın metilasyon ile ilişkili olup olmadığı; diğer taraftan da metilasyon gözlenen genlerin ekspresyon azalmasına sebep olup olmadığı incelendi. Gen ekspresyon değişiklikleri sürekli sayısal değerleri ile, ancak parametrik olmadan analiz edildiğinde, ekspresyondaki azalmayı açıklayabilecek metilasyon durumu yalnızca BRCA1 geni için geçerliydi. BRCA1 promotor bölgesinde metilasyon saptanan hastalarda, gen ekspresyonunun diğer hastalara kıyasla daha da azalmış olduğu gözlemlendi ($p=0,048$). Bu durum meme kanserindeki diğer bazı çalışmalar ile de gösterilmişti [473-476]. Diğer kanser türlerinde de benzer durum mevcuttu [477,479].

RASSF1 ekspresyon düzeylerindeki azalış sadece metilasyon durumu ile açıklanamazken, sadece metilasyon olmadığı durumlarda gen ekspresyonunda artış gözlemlendiği görülmüştür ($p=0,041$). Bu RASSF1'deki ekspresyon azalmasında farklı mekanizmaların da etkili olduğunu gösterirken, ekspresyon artışının metilasyon ile kontrol altında tutulabildiğini düşündürmektedir.

5. GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN PREDİKTİF VE PROGNOSTİK FAKTÖRLERE ETKİSİ

Soygeçmişinde kanser hikayesi veren bireyler meme kanseri için artmış riske sahiptirler. Bu riskin bir sebebi de genetik temelli olup, bazı gen bölgelerindeki mutasyonlara bağlıdır. Bizim çalışmamızda, CDH13, CDKN2B, TP53 ve TP73 ekspresyon düzeyleri, aile hikayesi olan bireylerde anlamlı derecede farklı olarak saptanmıştır (sırasıyla $p = 0,001$; $0,004$; $0,006$ ve $0,001$). Aile hikayesi olan bireylerde CDH13 geninin seviyesindeki azalma miktarı daha fazla iken, CDKN2B, TP53 ve TP73 genlerinin ise ekspresyon seviyelerinde daha fazla artış mevcuttu. Diğer taraftan aile hikayesi olan bireylerde hastalık daha agresif fenotip sergilemekteydi. Öyleyse bu genlerin ekspresyon durumunun aile hikayesinden çok kanserin diğer prognostik faktörleriyle ilgisi düşünülmüştür. Ancak bu ilişkileri yalnızca daha yüksek hasta sayıları ile daha ileri istatistik analizler uygulayarak ortaya koymak mümkün olabilir.

Ayrıca Gebelik sayısı az olan hastalarda PTEN ekspresyonunun daha düşük olduğu gözlenmiştir ($p < 0,001$). Ancak bu durumun örneklerin alt gruplara homojen dağılmaması sebebiyle meydana çıkmış olması da olasıdır. İstatistiksel hesaplamalar, az sayıda örnek ile değerlendirildiğinde anlamlı p değerleri elde edilse dahi, istatistiki tahmin gücü düşük ve yanıltıcı olabilmektedir.

CD44 ve BRCA2 ekspresyonlarındaki artış ile BRCA1 ekspresyonundaki azalış uzak metastaz durumu ile anlamlı derecede ilişkiliydi (sırasıyla $p = 0,016$; $0,033$ ve $0,033$). CD44'ün tümörigenezde metastaz ve invazyon üzerindeki rolü hakkında farklı düşünceler öne sürülmüştür. Bazı yazarlar tümör progresyonu ve metastazda rol oynadığını öne sürerken [447-450,481], bazı yazarlar ise bu aşamaları inhibe ettiğini savunmaktadır [451,452,480]. CD44'ün farklı varyantları sebebiyle bu tabloya sebep verdiği düşünülmektedir. Tümör hücre kültüründe yapılan bir çalışmada CD44 standart formunun antisens dizisi ile transfeksiyonun tümör hücre büyümesi ve metastazı inhibe ettiği gösterilmiştir [453]. Klinik çalışmalarda metastatik meme kanseri dokularında [454] ve ayrıca dissemine tumor hücrelerinin oluşturduğu sekonder doku alanlarında CD44 ekspresyonundaki artış gösterilmiştir [482,483]. Bir hyaloüronik asit reseptörü olan ve basal membran komponentleri ile ilişkide olan

CD44'ün yüksek seviyelerde eksprese edilmesi ile invazyon ve metastazı teşvik ediyor olabilir. Nitekim, invazif meme kanseri hücre hatlarında, CD44 sinyal yolağının iki güçlü kollajen yıkan enzim olan sistein proteaz katapsin K ve matris metalloproteinaz MT1-MMP ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [484]. Bir başka çalışmada, premenopozal meme kanseri hastalarında BRCA1 azalmış ekspresyonunun kötü prognozla ilişkisi görülürken, BRCA2 artmış ekspresyonu gösterilmiş ancak ekspresyon seviyesi ile prognostik faktörler arasında bağlantı kurulamamıştır [485,486].

Diğer taraftan BRCA2 ekspresyonundaki artmanın kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve aynı zamanda bunun ER negative tümörlerde daha belirgin olduğu söylenmiştir [487,488]. BRCA2 artışının neoadjuvan taksan tedavisine direnç ile ilişkisi de gösterilmiştir [489]. Benzer şekilde BRCA1 in survivin proteinini baskılayarak taksan tedavisine hassasiyeti teşvik ettiği [490] de gözlenmiş olup, azalmış BRCA1 ekspresyon düzeylerinin de taksana yanıtızsızlık ile ilişkilendirilmesi olasıdır. BRCA1 ekspresyon düzeylerinde azalma meme kanseri dokularında sıklıkla gösterilmekte olup [491], kimi zaman artmış invazyon, ileri evre gibi kötü prognoz belirteçleri ile ilişkilendirilirken [492-495], kimi zaman da prognostik belirleyiciliği ve tedaviye cevabı anlamlı olmamıştır [491]. Hatta azalmış BRCA1 ekspresyonu ile uzamış sağkalımın ilişkilendirildiği çalışmalar da mevcuttur [496].

CD44 ekspresyonunun ER negatif hastalarda istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu gözlemlendi ($p=0,006$). Bu bulgu, daha fazla sayıda meme tümörü hasta dokuları ile yapılan benzer çalışmalar ile de tutarlıdır [484,497]. BRCA1 ve ESR1 gen ekspresyonu düzeylerindeki azalma da, diğer bazı çalışmalar ile tutarlı şekilde [492,493,498], östrojen reseptörü imünohistokimya sonuçları ilişkili idi (sırasıyla $p=0,007$ ve $0,004$). Östrojen Reseptörü pozitif ve negatif olan tümörlerin klinik karakterleri ve risk faktörlerinin farklı olmakla birlikte Östrojen reseptörünün meme kanseri gelişimindeki rolü net değildir [455]. Ancak meme tümörlerinin yaklaşık üçte biri tanı sırasında ER negatiftir ve bazıları da hastalık seyrinde negatifleşirler [456]. Genellikle ER pozitif tümörlerin daha iyi prognoz gösterdiği ve hormonal tedaviye cevap verdiği gözlenmektedir [457,458]. O halde BRCA1 ve östrojen reseptörünün meme kanseri ile daha çok ilişkilendirilen alfa formunu kodlayan ESR1 düzeylerindeki azalma ile birlikte, CD44 düzeyindeki artış, kötü prognoz ve hormon tedavisine yanıtızsızlık ile ilişkilendirebilir. ESR1 geni ekspresyon düzeylerinin azalmasının

yine bir kötü prognoz belirteci olan mitotik aktivite artışı ilişkili olduğu saptanmıştır (p=0,046). Zaten ER pozitif tümörlerde dahi ESR1 ekspresyon azlığının hormonal tedaviye yanıtızlık ve kötü prognozla ilişkisi gösterilmiştir [499].

Benzer şekilde HER2 negatif tümörlerde CD44 ve BRCA2 düzeyinde de anlamlı artış gözlandı (sırasıyla p=0,033 ve p<0,001). Meme kanserinde BRCA2 seviyesinin HER2 + tümörlerde artmış olduğu da söylenmiştir [486]. Ancak HER2, meme tümörlerinin yaklaşık %20'sinde artmış seviyelerde gözlenen ve hormon tedavisine direnç ve kötü prognoz ile ilişkilendirilen bir faktördür [459]. Bu bulgu BRCA2 ile birlikte CD44'un yine kötü prognozla ilişkisini desteklemektedir. BRCA1 ile HER2 seviyeleri arasında ise ilişki görülmemiştir [493].

Diğer taraftan, sağkalım oranları ile CD44 seviyeleri retrospektif olarak değerlendirildiğinde CD44'un artmış seviyelerinin iyi prognozla orantılı olduğu görülmüştür [497]. Belki de sağ kalımı tahmin etmede moleküler belirteçlerin, halen kullanılan histopatolojik prognostik faktörlerin yerine, doğrudan prediktif olarak kullanılması gerekli olabilir.

ESR1 ekspresyonu, farklı histolojik tipteki tümörlerde farklı olarak gözlandı. Duktal ve lobüler tip meme kanserlerinde ESR1 anlamlı derecede azalmışken, mikt tip tümörlerde hemen hemen hiç değişmediği gözlandı (p=0,019). Tipler arasında ER ve HER2 durumu açısından anlamlı fark yoktu. Duktal ve lobüler tipin diğer spesifik histolojik tiplerden ayrılmasının altında yatan sebeplerden birinin de ESR1 geni ile ilişkili mekanizmalar üzerinden olduğu düşünöldü. Nadir bir tip olan *clear cell* karsinomundan alınan doku örneğinde ise ESR1 artmış olarak saptandı.

6. METİLASYON DURUMLARININ PREDİKTİF VE PROGNOSTİK FAKTÖRLERE ETKİSİ

Örnekler arasında zaten düşük oranda gözlenen metilasyon paternlerinin aynı zamanda dağınık olması, her bir alt grup için sayıyı çok azaltmış, çoğu değerlendirmede alt gruplarda hiç birey kalmamıştır. Bu sebeple istatistiksel hesaplamalar kategorize olmayan beta skorları ile ancak parametrik olmayan şekilde tekrarlanmıştır. Bu şekilde, metilasyon gözlenen genler ile prediktif ve prognostik faktörlerin arasında istatistiksel olarak anlamlı olan birçok ilişki hesaplanmıştır.

Ancak bunlar incelendiğinde, çok azının gerçek bir ilişki modelini gösterebildiği gözlenmiştir. Ailede kanser hikayesi, birçok genin metilasyon durumu ile anlamlı ilişki içermekteydi. Sözü geçen genler için çok az sayıda metilasyon pozitif örnek olması sebebiyle bu durum için, daha agresif tümör davranışının gözlendiği bu hastalarda, ailede kanser hikayesinin karıştırıcı olabileceği ihtimali düşünüldü.

RASSF1 metilasyon durumu ile tanı yaşı arasında anlamlı bir ilişki gözlendi ($p=0,043$). Genç yaşta tanı konan hastalarda RASSF1 geni genellikle metile değilken, ileri yaşta tanı konan hastalarda RASSF1 hipermetilasyonu daha sık gözlenmekteydi.

ESR1 promotorunun metile olarak gözlendiği hastaların HER2 negatif hastalar olduğu gözlendi ($p=0,016$). Hipermetile ESR1 gen promotor bölgesi hormonal tedaviye direnç ile ilişkili iken, bölgenin Azasitidin [500] veya Ribavirin ile demetilasyonu sonrası tamoksifene yanıtın arttığı gösterilmiştir [501,502]. Belki de tedaviye dirençli hastalara ek tedavi önerilmesi için ESR1 metilasyon durumunun takibi önemli olabilir.

GSTP1 hipermetilasyonları meme kanserinde sıklıkla gözlenmekle birlikte [503-506], nod pozitifliği [504], ileri histolojik *grade* [505], ER negatifliği ve hormonal tedaviye yanıtızsızlık ile ilişkilendirilmiştir [506]. Ayrıca GSTP1 hipermetilasyonunun hasta serumlarında tespit edildiği [503,507,508] ve bunun ER negatifliği ve kötü prognoz ile ilişkisi söylenmiştir [506]. Ancak ince iğne biyopsilerinde in situ ve Evre I kanserlerde de gösterilmiştir [509]. Biz, GSTP1 hipermetilasyonunun evre IV ve uzak metastaz varlığında anlamlı derecede sık gözlendiğini gördük ($p=0,036$). ER pozitif ve negatif hastalar arasında ise GSTP1 metilasyon durumu arasında fark yoktu. Halen meme kanserinin prediktif ve

prognostik değerlendirmesinde GSTP1'in rolünün net olarak açıklanamazken, biz de çoğu çalışmada savunulan GSTP1 metilasyonu ile kötü prognostik değerlerin birlikteliğini gözlemekteyiz. Ancak bu sonuçlardan net çıkarımlar yapmak veya mekanizmayı açıklamaya çalışmak yanıltıcı olacaktır.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsan genom projesinin tamamlanmasından beri geçen süre içinde araştırmacılar laboratuvardaki bulguları hastalar için daha iyi tedavi yöntemlerine aktarmak için kullanmaya başladı. Ancak laboratuvar dan kliniğe doğru olan bilgi akışının güçlenmesi ve kullanılabilir hale gelebilmesi için klinikten da laboratuvara bilgi akışının engelsiz ve sürekli olması gerektiğini düşünüyoruz. Ancak hastalığın, genetik, çevresel ve hayat tarzı etkenlerinin ilişkisiyle zaman içinde gelişen bir süreç olarak ele alınması gerekli olduğundan özellikle kanser alanında yapılan ve yapılacak olan moleküler çalışmaların değerliliğinin artmasının ancak klinik ve laboratuvar arasındaki sıkı işbirliği içinde olması mümkündür.

Halen büyük ölçüde cerrahi ve histopatolojik kriterler doğrultusunda göre sınıflandırılan meme kanserinde moleküler belirteçlerin giderek daha fazla kullanılmaya başlanması ile hastalığın prognozunun daha iyi tahmin edilmesi ve daha doğru tedavi yaklaşımları tercih edilmesi olasıdır. Örneğin azalmış BRCA1 ve ESR1 düzeyleri ile artmış CD44 ve BRCA düzeylerinin kötü prognozu ve hormon tedavisine direnci belirtebilmektedir. Benzer şekilde azalmış CDH13 düzeyleri ile birlikte giden artmış CD44 düzeylerinin invazyon ve uzak metastaza eğilimi gösteriyor olabilir. Ekspresyon belirteçleri gibi epigenetik belirteçlerin de, örneğin GSTP1 hipermetilasyonunun son evre hastalıklar ile birlikteliği veya ESR1 promotor metilasyonunun hormon tedavisine yanıtızsızlık ve kötü prognoz ile ilişkisi veya RASSF1 hipermetilasyonunun geç yaşta ortaya çıkan kanser ile ilişkisi, belki de yakın gelecekte bu ölçümlerin meme kanseri tanısı, tedavi seçimi ve takibinde rutin uygulamalar arasında yer alabileceğini düşündürmektedir.

Bu yolda, çoğunlukla küçük gruplarda (<100 hasta) ve farklı teknikler ile yapılan ve değerlendirilen çalışmaların sonuçlarının birleştirilmesi ve standardizasyonu önemlidir. Güçlü istatistiksel sonuçları elde etmek için veri madenciliği olarak isimlendirilen kümeleme ve çok değişkenli regresyon hesaplamalarının kombinasyonundan oluşan ileri istatistiksel analizlerin uygulanabilmesi için geniş hasta grupları şarttır. Bu sebeple, geniş gruplar ile çok değerli çalışmaların hızlı ve güvenilir şekilde yapılmasına imkan sağlayacak tümör biyobankalarının oluşturulması ve devamlılığının sağlanması öncelikli hedeflerden olmalıdır.

VII. KAYNAKLAR

- [1] Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, *et al.* Global Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta, GA: American Cancer Society 2007
- [2] Colditz GA, Sellers TA, Trapido E. Epidemiology – identifying the causes and preventability of cancer? Nat Rev 2006 ;6:75-83
- [3] American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2007-2008 Atlanta
- [4] Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, *et al.* Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. Int J Epidemiol 2005; 34:405-412
- [5] Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, *et al.* SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/, based on November 2006 SEER data submission, posted to the SEER Web site 2007. Erişim tarihi: 20.12.2008
- [6] URL: www.ism.gov.tr/kidem/index.html. Erişim tarihi 20.12.2008
- [7] Haydaroglu A, Dubova S, Özşaran Z, Bölükbaşı Y , Yılmaz R, Kapkaç M, Özdedeli E Ege Üniversitesinde Meme Kanseri: 3897 Olgunun Değerlendirilmesi Meme Sağlığı Dergisi 2005; 1(1):6-11
- [8] Denoix PF. Nomenclature classification des cancers [in French]. Bull Inst Nat Hyg (Paris) 1952; 7:743–748
- [9] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000; 406:747-752
- [10] Draft Guidance for Industry, Clinical Laboratories and FDA Staff - In Vitro Diagnostic Multivariate Index Analysis, URL: www.fda.gov. Erişim tarihi 23.12.2008
- [11] Delgado MD, León J. Gene expression regulation and cancer. Clin Transl Oncol 2006; 8(11):780-7
- [12] Spratt JS, Tabin GR, Donegan WL, Spratt JS, *et al.* Gross anatomy of the breast. Cancer of the breast. 4th edition. Philadelphia. London: W.B.Saunders 1995; 22-42
- [13] Kalaycı G, Acarlı K, Demirkol K, Ertekin C. Meme anatomisi ve gelişmesi. Genel cerrahi cilt 1. Türkiye, İstanbul. Nobel 2002; 537-542

- [14] Osborne MP, Harris JR, Helleman S, Henderson IC, *et al.* Breast development and anatomy. Breast disease. Philadelphia: J.B Lippincott 1991; 1-13
- [15] Romrell LJ, Blend KI, Copeland EM. Anatomy of the breast, axilla, chest wall and related metastatic sites.. The breast comprehensive management of benign and malignant disease. Philadelphia, London WB Saunders 1995; 16-21
- [16] Hennighausen L, Robinson G. Information networks in the mammary gland. Nat Rev Mol Cell Biol 2005; 6:715–725
- [17] McGee SF, Fiona Lanigan F, Emer Gilliga E, Bernd Groner B. Mammary gland biology and breast cancer EMBO reports 2006; 7:(11) 1084-88
- [18] Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, *et al.* The organising principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. Differentiation 2002; 70:537–546
- [19] O’Brien LE, Zegers MM, Mostov KE. Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3:531–537
- [20] Rodriguez-Boulan E, Salas PJ. External and internal signals for epithelial cell surface polarization. Annu Rev Physiol 1989; 51:741–754
- [21] Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. Cell 2000; 100:57–70
- [22] Fedi P, Tronick SR, Aaronson SA, Holland JF, *et al.* Growth factors. Cancer Medicine 2000; 41-64
- [23] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987; 235:177–182
- [24] Yarden Y, Ullrich A. EGF and erbB2 receptor tumors. Growth factor receptor tyrosine kinases. Annu Rev Biochem 1988; 57:443–478
- [25] Hunter T. Oncoprotein networks. Cell 1997; 88:333–346
- [26] Rommel C, Hafen E. Ras: a versatile cellular switch. Curr Opin Genet Dev 1988; 8:412–418
- [27] Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 1995; 81:323–330
- [28] Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy.

- CA Cancer J Clin 2005; 55:178-194
- [29] Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:401-410
- [30] Vargo-Gogola T & Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Reviews* 2007; *Cancer* 7:659-672
- [31] Lawrence M, Harold LA, Bonnie Genes BA, Chromatin and Breast Cancer; Epigenetic Tale. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2001; 6:169-182
- [32] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414:105-111
- [33] National Cancer Institute Breast Cancer Progress Report: Addressing the Recommendations of the Breast Cancer Progress Review Group, October 2004
- [34] Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and trans differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:387-403
- [35] Kordon EC, Smith GH. An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development* 1998;125(10):1921-1930
- [36] Polyak K. Breast cancer: origins and evolution *J Clin Invest* 2007; 117:3155–3163
- [37] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(7):3983-3988
- [38] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001; 358(9291):1389-1399
- [39] National Cancer Institute. Genetics of Breast and Ovarian Cancer (PDQ). URL: www.cancer.gov/cancertopics/pdq/genetics/breast-and-ovarian/healthprofessional. Erişim tarihi 15.12.2008
- [40] Ford D, Easton DF, Stratton M, *et al.* Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* Mar 1998; 62(3):676-689

- [41] Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, *et al.* Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003; 72(5):1117-1130
- [42] Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, *et al.* Environmental and heritable factors in the causation of cancer – analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343(2):78-85
- [43] Clin OJ. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic testing for cancer susceptibility 2003; 21(12):2397-2406
- [44] Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* 2001; 38(1):103-113; discussion 113-106
- [45] Ellsworth RE, Decewicz DJ, Shriver CD. Breast cancer in the personal genomics era. *Curr Genomics* 2010; 11:146–61
- [46] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50,302 women with breast cancer and 96,973 women without the disease. *Lancet* 2002; 360(9328):187-195
- [47] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53,297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 1996; 347(9017):1713- 1727
- [48] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 1997; 350(9084):1047-1059
- [49] Li CI, Malone KE, Porter PL, *et al.* Relationship between long durations and different regimens of hormone therapy and risk of breast cancer. *JAMA* 2003; 289(24):3254-3263
- [50] Stefanick ML, Anderson GL, Margolis KL, *et al.* Effects of conjugated equine estrogens on breast cancer and mammography screening in postmenopausal women

- with hysterectomy. JAMA 2006; 295(14):1647-1657
- [51] Zhang SM, Manson JE, Rexrode KM, Cook NR, *et al.* Use of oral conjugated estrogen alone and risk of breast cancer. Am J Epidemiol 2007; 165(5):524-529
- [52] Barlow WE, White E, Ballard-Barbash R, *et al.* Prospective breast cancer risk prediction model for women undergoing screening mammography. J Natl Cancer Inst 2006 ; 98(17):1204-1214
- [53] Boyd NF, Guo H, Martin LJ, *et al.* Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. N Engl J Med 2007; 356(3):227-236
- [54] Byrne C, Schairer C, Brinton LA, *et al.* Effects of mammographic density and benign breast disease on breast cancer risk (United States). Cancer Causes Control 2001; 12(2):103-110
- [55] Eliassen AH, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, Hankinson SE. Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer. JAMA 2006; 296(2):193-201
- [56] Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Weight control and physical activity in cancer prevention. Obes Rev 2002; 3(1):5-8
- [57] Lahmann PH, Friedenreich C, Schuit AJ, *et al.* Physical activity and breast cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007; 16(1):36-42
- [58] The National Heart Lung and Blood Institute. Postmenopausal Hormone Therapy: Facts About Postmenopausal Hormone Therapy, URL: www.nhlbi.nih.gov/health/women/pht_facts.htm
- [59] International Agency for Cancer Research (IARC). Weight control and physical activity. IARC Handbook of Cancer Prevention. Volume 6. Lyon, IARC Press 2002
- [60] McTiernan A, Kooperberg C, White E, *et al.* Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. JAMA 2003; 290(10):1331-1336
- [61] Fentiman IS. Fixed and modifiable risk factors for breast cancer. Int J Clin Pract 2001; 55(8):527-530
- [62] Hamajima N, Hirose K, Tajima K, *et al.* Alcohol, tobacco and breast cancer – collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including

- 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer* 2002; 87(11):1234-1245
- [63] Terry MB, Zhang FF, Kabat G, et al. Lifetime alcohol intake and breast cancer risk. *Ann Epidemiol* 2006; 16(3):230-240
- [64] Zhang SM, Lee IM, Manson JE, Cook NR, *et al.* Alcohol consumption and breast cancer risk in the Women's Health Study. *Am J Epidemiol* 2007; 165(6):667-676
- [65] Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA* 2001; 286(17):2143-2151
- [66] International Agency for Research on Cancer (IARC) monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. Lyon, IARC Press 2004
- [67] Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, *et al.* Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 2003; 289(24):3243-3253
- [68] Anderson GL, Chlebowski RT, Rossouw JE, *et al.* Prior hormone therapy and breast cancer risk in the Women's Health Initiative randomized trial of estrogen plus progestin. *Maturitas* 2006; 55(2):103-115
- [69] US Preventive Services Task Force. Postmenopausal hormone replacement therapy for primary prevention of chronic conditions: recommendations and rationale. *Ann Intern Med* 2002; 137(10):834-839
- [70] World Health Organization. Histological typing of breast tumours. 2nd ed. 1981, Geneva, Switzerland
- [71] Bosze P. Prognostic factors and staging the rol of molecular markers CME *J Gynecologic Oncology* 2001; 6:232-234
- [72] R.E. Mansel *et al.*, *Metastasis of Breast Cancer*, Netherlands: Springer 2008; 279–305
- [73] Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17:R245–62
- [74] Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr* 1994; 16:35–42
- [75] Sinha S, Chunder N, Mukherjee N, *et al.* Frequent deletion and methylation in

- SH3GL2 and CDKN2A loci are associated with early- and late-onset breast carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2008; 15:1070–80
- [76] International Union Against Cancer. TNM Classification of Malignant Tumours. Geneva, Switzerland: International Union Against Cancer 1968
- [77] Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin* 2006; 56(1):37-47
- [78] Beahrs OH, Carr DT, Rubin P, *et al.* Manual for Staging of Cancer. 2nd ed. Philadelphia, Lippincott 1977
- [79] Hermanek P, Gospodarowicz MK, Henson DE, *et al.* International Union Against Cancer (UICC): Prognostic Factors in Cancer. New York, Springer-Verlag 1995
- [80] Gospodarowicz MK, Henson DE, Hutter RV, *et al.* Prognostic Factors in Cancer. 2nd ed. New York, Wiley-Liss 2001
- [81] Gospodarowicz MK, O'Sullivan B, Sobin LH. Prognostic Factors in Cancer. 3rd ed. New York, Wiley 2006
- [82] Greene FL, Page DL, Fleming ID, *et al.* AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York, Springer 2002
- [83] Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer (UICC) TNM Classification Of Malignant Tumors. 6th ed. New York, Wiley- Liss 2002
- [84] Edge SB, Compton CC. The AJCC the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Annals of Surgical Oncology* 2010
- [85] URL: www.cancerstaging.org, Erişim: 07.12.2012
- [86] Sorlie T, Tibshirani R, Parker J *et al.* Repeated observation of breast tumor sub types in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:8418–8423
- [87] Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10869–10874
- [88] Pusztai L, Ayers M, Stec J *et al.* Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive

- tumors. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2406–2415
- [89] Sotiriou C, Neo SY, McShane LM *et al.* Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:10393–10398
- [90] Fan C, Oh DS, Wessels L *et al.* Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:560–569
- [91] Hu Z, Fan C, Oh DS *et al.* The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006; 7:96
- [92] Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10:5367–5374
- [93] Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H *et al.* Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2007; 9:R65
- [94] Rouzier R, Perou CM, Symmans WF *et al.* Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11:5678–5685
- [95] Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 2004; 116 (2):235–46
- [96] Yoshida BA, Sokoloff MM, Welch DR, Rinker-Schaeffer CW. Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J Natl Cancer Inst* 1992; (21):1717–30
- [97] Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, *et al.* A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995; 268(5218):1749-53
- [98] Kobayashi J. Molecular mechanism of the recruitment of NBS1/hMRE11/hRAD50 complex to DNA double-strand breaks: NBS1 binds to gamma-H2AX through FHA/BRCT domain. *J Radiat Res* 2004; 45(4):473–8
- [99] Lee JH, Paull TT. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* 2007; 26 (56): 7741–8
- [100] Chen J. Ataxia telangiectasia-related protein is involved in the phosphorylation of BRCA1 following deoxyribonucleic acid damage. *Cancer Res* 2000; 60(18):5037–9
- [101] Friedenson B. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to

- breast and ovarian cancers. *BMC Cancer* 2007; 7:152
- [102] Chunder N, Mandal S, Roy A, *et al.* Differential association of BRCA1 and BRCA2 genes with some breast cancer-associated genes in early and late onset breast tumors. *Ann Surg Oncol* 2004; 11:1045–55
- [103] Ding SL, Sheu LF, Yu JC, *et al.* Abnormality of the DNA double-strand-break checkpoint/ repair genes, ATM, BRCA1 and TP53, in breast cancer is related to tumour grade. *Br J Cancer* 2004; 90:1995–2001
- [104] Prokopcova J, Kleibl Z, Banwell MC, *et al.* The role of ATM in breast cancer development. *Cancer Res Treat* 2007; 104:121–8
- [105] Treilleux I, Chapot B, Goddard S, *et al.* The molecular causes of low ATM protein expression in breast carcinoma; promoter methylation and levels of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. *Histopathology* 2007; 51:63–9
- [106] Ye C, Cai Q, Dai Q, *et al.* Expression patterns of the ATM gene in mammary tissues and their associations with breast cancer survival. *Cancer* 2007; 109:1729–35
- [107] Paterson JW. BRCA1: a review of structure and putative functions. *Dis Markers* 1998; 13(4):261–74
- [108] Boulton SJ. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochemical Society Transactions* 2006; 34(5):633–645
- [109] Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, *et al.* BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 2000; 14 (8):927–39
- [110] Friedenson B. Inflammatory processes inordinately increase tissue specific cancer risks in carriers of mutations in BRCA1, BRCA2, ATM or Fanconi anemia genes. *Journal of Medicine and Medical Sciences* 2000; 1 (8):356–371
- [111] Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, *et al.* Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994; 265(5181):2088–90
- [112] Friedenson B. Breast cancer genes protect against some leukemias and lymphomas. 2008
- [113] Cox A, Dunning AM, Garcia-Closas M, Balasubramanian S, *et al.* A common coding

- variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nat Genet* 2007; 39(3):352-8
- [114] Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, *et al.* Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 2007; 447:1087–93
- [115] Frank B, Bermejo JL, Hemminki K, Klaes R, *et al.* Association of a common variant of the CASP8 gene with reduced risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(13):1012-3
- [116] MacPherson G, Healey CS, Teare MD, Balasubramanian SP, *et al.* Association of a common variant of the CASP8 gene with reduced risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(24):1866-9
- [117] Haiman CA, Garcia RR, Kolonel LN, Henderson BE, *et al.* Promoter polymorphism in the CASP8 gene is not associated with cancer risk. *Nat Genet* 2008; 40(3):259-60
- [118] Kordi Tamandani DM, Sobti RC, Shekari M, Huria A. CpG island methylation of TMS1/ASC and CASP8 genes in cervical cancer. *Eur J Med Res* 2009; 14(2):71–75
- [119] Chatterjee K, Williamson AL, Hoffman M, Dandara C. CASP8 promoter polymorphism is associated with high-risk HPV types and abnormal cytology but not with cervical cancer. *J Med Virol* 2011; 83(4):630-6
- [120] Cox A, Dunning AM, Garcia-Closas M, *et al.* A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nat Genet* 2007; 39:352–8
- [121] Stacey SN, Manolescu A, Sulem P, *et al.* Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat Genet* 2007; 39:865–9
- [122] Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, *et al.* A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet* 2007; 39:870–4
- [123] MacPherson G, Healey CS, Teare D, *et al.* Association of a common variant of the CASP8 gene with reduced risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1866–9
- [124] Siegel RM. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol.* 2006 ;6:308–17
- [125] Spring FA, Dalchau R, Daniels GL, Mallinson G, *et al.* The Ina and Inb blood group antigens are located on a glycoprotein of 80,000 MW (the CDw44 glycoprotein)

- whose expression is influenced by the In(Lu) gene. *Immunology* 1988; 64(1):37–43
- [126] Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* 1999; 52(4):189–96
- [127] Oxley SM, Sackstein R. Detection of an L-selectin ligand on a hematopoietic progenitor cell line. *Blood* 1994; 84(10):3299–306
- [128] Sackstein R, Dimitroff CJ. A hematopoietic cell L-selectin ligand that is distinct from PSGL-1 and displays N-glycan-dependent binding activity. *Blood* 2000; 96(8):2765–74
- [129] Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, *et al.* Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med* 2008; 14(2):181–7
- [130] Dimitroff CJ, Lee JY, Raffi S, Fuhlbrigge RC, *et al.* Cd44 Is a Major E-Selectin Ligand on Human Hematopoietic Progenitor Cells. *J Cell Biol* 2001; 153(6):1277–86
- [131] Hanley WD, Burdick MM, Konstantopoulos K, Sackstein R. CD44 on LS174T colon carcinoma cells possesses E-selectin ligand activity. *Cancer Res* 2005; 65(13):5812–7
- [132] Burdick MM, Chu JT, Godar S, Sackstein R. HCELL is the major E- and L-selectin ligand expressed on LS174T colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 2006; 281(20):13899–905
- [133] Hanley WD, Napier SL, Burdick MM, Schnaar RL, *et al.* Variant isoforms of CD44 are P- and L-selectin ligands on colon carcinoma cells. *FASEB J* 2005; 20(2): 337–9
- [134] Napier SL, Healy ZR, Schnaar RL, Konstantopoulos K, *et al.* Selectin ligand expression regulates the initial vascular interactions of colon carcinoma cells: the roles of CD44v and alternative sialofucosylated selectin ligands. *J Biol Chem* 2007; 282(6):3433–41
- [135] Thomas SN, Zhu F, Schnaar RL, Alves CS, *et al.* Carcinoembryonic Antigen and CD44 Variant Isoforms Cooperate to Mediate Colon Carcinoma Cell Adhesion to E- and L-selectin in Shear Flow. *J Biol Chem* 2008; 283 (23): 15647–55
- [136] Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res* 2007; 17(1): 3–14
- [137] Sillanpää S, Anttila MA, Voutilainen K, Tammi RH, *et al.* CD44 expression indicates

- favorable prognosis in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(14):5318–24
- [138] Wang SJ, Wong G, de Heer AM, Xia W, *et al.* CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Laryngoscope* 2009; 119(8):1518–30
- [139] Assimakopoulos D, Kolettas E, Patrikakos G, Evangelou A. The role of CD44 in the development and prognosis of head and neck squamous cell carcinomas. *Histol Histopathol* 2002; 17(4):1269–81
- [140] Lee SW. H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer. *Nat Med* 1996; 2(7):776–82
- [141] Tanihara H, Sano K, Heimark RL, *et al.* Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin. *Cell Adhes Commun* 1995; 2(1):15–26
- [142] Ranscht B, Dours-Zimmermann MT. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. *Neuron* 1991; 7(3):391–402
- [143] Resink TJ, Kuzmenko YS, Kern F, *et al.* LDL binds to surface-expressed human T-cadherin in transfected HEK293 cells and influences homophilic adhesive interactions. *FEBS Lett* 2000; 463(1–2):29–34
- [144] Kremmidiotis G, Baker E, Crawford J, *et al.* Localization of human cadherin genes to chromosome regions exhibiting cancer-related loss of heterozygosity. *Genomics* 1998; 49(3):467–71
- [145] Sato M, Mori Y, Sakurada A, *et al.* The H-cadherin (CDH13) gene is inactivated in human lung cancer. *Hum Genet* 1998; 103(1): 96–101
- [146] Roman-Gomez J, Castillejo JA, Jimenez A, *et al.* Cadherin-13, a mediator of calcium-dependent cell–cell adhesion, is silenced by methylation in chronic myeloid leukemia and correlates with pretreatment risk profile and cytogenetic response to interferon alfa. *J Clin Oncol* 2003; 21(8):1472–9
- [147] Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, *et al.* Aberrant methylation of the CDH13 (H-cadherin) promoter region in colorectal cancers and adenomas. *Cancer Res* 2002; 62(12):3382–6

- [148] Takeuchi T, Liang SB, Matsuyoshi N, *et al.* Loss of T-cadherin (CDH13, H-cadherin) expression in cutaneous squamous cell carcinoma. *Lab Invest* 2002; 82(8):1023–9
- [149] Takeuchi T, Liang SB, Ohtsuki Y. Downregulation of expression of a novel cadherin molecule, T-cadherin, in basal cell carcinoma of the skin. *Mol Carcinog* 2003; 35(4):173–9
- [150] Widschwendter M, Siegmund KD, Muller HM, Fiegl H, *et al.* Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res* 2004; 64:3807–3813
- [151] Feng W, Shen L, Wen S, Rosen DG, *et al.* Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers. *Breast Cancer Res* 2007; 9(4):R57
- [152] Fiegl H, Millinger S, Goebel G, Muller-Holzner E, *et al.* Breast cancer DNA methylation profiles in cancer cells and tumor stroma: association with HER-2/neu status in primary breast cancer. *Cancer Res* 2006; 66:29–33
- [153] Xu J, Shetty PB, Feng W, Chenault C, *et al.* Methylation of HIN-1, RASSF1A, RIL and CDH13 in breast cancer is associated with clinical characteristics, but only RASSF1A methylation is associated with outcome. *BMC Cancer* 2012; 12:243
- [154] Entrez Gene: CDKN2A cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4).
- [155] Pecorino L. *Molecular biology of cancer*. Oxford University Press, 2005, New York, Section 5.3
- [156] Caldas C, Hahn SA, Costa LT, Redston MS, *et al.* Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994; 8(1):27–32
- [157] Bartsch D, Shevlin DW, Tung WS, Kisker O, *et al.* Frequent mutations of CDKN2 in primary pancreatic adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 14(3):189–95
- [158] Liu L, Lassam NJ, Slingerland JM, Bailey D, *et al.* Germline p16INK4A mutation and protein dysfunction in a family with inherited melanoma. *Oncogene* 1995; 11(2):405–12

- [159] Igaki H, Sasaki H, Kishi T, Sakamoto H, *et al.* Highly frequent homozygous deletion of the p16 gene in esophageal cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203(2):1090–5
- [160] Liggett WH, Sidransky D . Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16(3):1197–206
- [161] Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001; 264(1):42–55
- [162] Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, *et al.* p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 2006; 443(7110):453–7
- [163] Liu Y, Sanoff HK, Cho H, Burd CE, *et al.* Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell* 2009; 8(4):439–48
- [164] Stone S, Dayananth P, Jiang P, *et al.* Genomic structure, expression and mutational analysis of the P15 (MTS2) gene. *Oncogene* 1995; 11(5):987–91
- [165] Xu XL, Yu J, Zhang HY, Sun MH, *et al.* Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10(23):3441-54
- [166] Bisogna M, Calvano JE, Ho GH, Orlow I, *et al.* Molecular analysis of the INK4A and INK4B gene loci in human breast cancer cell lines and primary carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 125(2):131-8
- [167] Jha AK, Nikbakht M, Jain V, Capalash N, *et al.* p16(INK4a) and p15(INK4b) gene promoter methylation in cervical cancer patients. *Oncol Lett* 2012; 3(6):1331-1335
- [168] Bai P, Xiao X, Zou J, Cui L, *et al.* Expression of p14(ARF), p15(INK4b), p16(INK4a) and skp2 increases during esophageal squamous cell cancer progression. *Exp Ther Med* 2012; 3(6):1026-1032
- [169] Gorgoulis VG, Koutroumbi EN, Kotsinas A, Zacharatos P, *et al.* Alterations of p16-pRb pathway and chromosome locus 9p21-22 in sporadic invasive breast carcinomas. *Mol Med* 1998; 4(12):807-22
- [170] Zhou JN, Linder S. Expression of CDK inhibitor genes in immortalized and carcinoma derived breast cell lines. *Anticancer Res* 1996; 16(4A):1931-5
- [171] Spanakis NE, Gorgoulis V, Mariatos G, Zacharatos P, *et al.* Aberrant p16 expression

- is correlated with hemizygous deletions at the 9p21-22 chromosome region in non-small cell lung carcinomas. *Anticancer Res* 1999; 19(3A):1893-9
- [172] Walter P, Green S, Greene G, Krust A, *et al.* Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(23):7889–93
- [173] Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, *et al.* International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 2006; 58(4): 773–81
- [174] Ali S, Coombes RC. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:101–12
- [175] Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:631–43
- [176] Welboren WJ, Stunnenberg HG, Sweep FC, *et al.* Identifying estrogen receptor target genes. *Mol Oncol* 2007; 1:138–43
- [177] Safe S, Kim K. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol* 2008; 41:263–75
- [178] Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2005; 23:1616–22
- [179] Kahn SA, Rogers MA, Khurana KK, *et al.* Estrogen receptor expression in benign breast epithelium and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:37–42
- [180] Ali SH, O'Donnell AL, Balu D, *et al.* Estrogen receptor- α in the inhibition of cancer growth and angiogenesis. *Cancer Res* 2000; 60:7094–8
- [181] Osborne CK, Zhao H, Fuqua SAW. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J Clin Oncol* 2000; 18:3172–86
- [182] Tomita S, Zhang Z, Nakano M, Ibusuki M, *et al.* Estrogen receptor alpha gene ESR1 amplification may predict endocrine therapy responsiveness in breast cancer patients. *Cancer Sci* 2009; 100(6):1012-7
- [183] Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, *et al.* Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1371–88
- [184] Jordan VC, O'Malley BW. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5815–24

- [185] Slattery ML, Curtin K, Giuliano AR, Sweeney C, *et al.* Active and passive smoking, IL6, ESR1, and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 109(1):101-11
- [186] Einarsdóttir K, Darabi H, Li Y, Low YL, *et al.* ESR1 and EGF genetic variation in relation to breast cancer risk and survival. *Breast Cancer Res* 2008; 10(1):R15
- [187] Shian-ling Ding, Jyh-Cherng Yu, Shou-Tung Chen, *et al.* Diverse Associations between ESR1 Polymorphism and Breast Cancer Development and Progression *Clin Cancer Res* 2010; 16:3473-3484
- [188] Martínez-Galán J, Torres B, Del Moral R, Muñoz-Gámez JA, *et al.* Quantitative detection of methylated ESR1 and 14-3-3-sigma gene promoters in serum as candidate biomarkers for diagnosis of breast cancer and evaluation of treatment efficacy. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(6):958-65
- [189] Li LC, Shiina H, Deguchi M, Zhao H, *et al.* Age-dependent methylation of ESR1 gene in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321(2):455-61
- [190] Smith CM, Bora PS, Bora NS, Jones C, *et al.* Genetic and radiation-reduced somatic cell hybrid sublocalization of the human GSTP1 gene. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 71(3):235–9
- [191] Franco RL, Schenka NG, Schenka AA, Rezende LF *et al.* Glutathione S-transferase Pi expression in invasive breast cancer and its relation with the clinical outcome. *J Buon* 2012; 17(2):259-64
- [192] Huang J, Tan PH, Thiyagarajan J, Bay BH. Prognostic significance of glutathione S-transferase-pi in invasive breast cancer. *Mod Pathol* 2003; 16(6):558-65
- [193] Perquin M, Oster T, Maul A, Froment N, *et al.* The glutathione-related detoxification pathway in the human breast: a highly coordinated system disrupted in the tumour tissues. *Cancer Lett* 2000; 158:7–16
- [194] Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992; 80:879–886
- [195] Armstrong JS, Jones DP. Glutathione depletion enforces the mitochondrial permeability transition and causes cell death in Bcl-2 overexpressing HL60 cells. *Faseb J* 2002; 16:1263–1265
- [196] Bernardini S, Bernassola F, Cortese C, Ballerini S, *et al.* Modulation of glutathione S-

- transferase P1-1 activity by polymerization during apoptosis. *J Cell Biochem* 2000; 77:645–653
- [197] Asakura T, Hashizume Y, Tashiro K, *et al.* Suppression of GST-P by treatment with glutathione-doxorubicin conjugate induces potent apoptosis in rat hepatoma cells. *Int J Cancer* 2001; 94:171–177
- [198] Natarajan AT, Vermeulen S, Darroudi F, Valentine MB, *et al.* Chromosomal localization of human O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (Mgmt) gene by in situ hybridization. *Mutagenesis* 1992; 7:83–85
- [199] Pegg AE. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyl-transferases. *Mutat Res* 2000; 462:83–100
- [200] Ochs K, Kaina B. Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res* 2000; 60:5815–5824
- [201] Cordeiro AT, Silva CM, Bartchewsky Júnior W, Ribeiro ML, *et al.* Evaluation of the expression of the MGMT gene in normal and neoplastic tissue of patients with colorectal cancer. *Rev Col Bras Cir* 2012; 39(1):48-53
- [202] Neto JC, Ikoma MM, Carvalho KC, Vassallo J, *et al.* MGMT and PTEN as potential prognostic markers in breast cancer. *Exp Mol Pathol* 2012; 92(1):20-6
- [203] Fumagalli C, Pruneri G, Possanzini P, Manzotti M, *et al.* Methylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter gene in triple-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134(1):131-7
- [204] Osanai T, Takagi Y, Toriya Y, Nakagawa T, *et al.* Inverse correlation between the expression of O6-methylguanine-DNA methyl transferase (MGMT) and p53 in breast cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2005 Mar;35(3):121-5.
- [205] Chintamani, Jha BP, Bhandari V, Bansal A, *et al.* The expression of mismatched repair genes and their correlation with clinicopathological parameters and response to neo-adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Int Semin Surg Oncol* 2007; 4:5
- [206] Clemons MJ, Bibby MC, El Terai W H, Forster G, *et al.* Heterogeneity of O6 alkylguanine DNA-alkyltransferase expression in human breast tumours. *Br J Cancer* 2002; 86:1797–1802

- [207] Kolodner RD. Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends Biochem Sci* 1996; 20(10):397–401
- [208] Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:335–346
- [209] Wong JJ, Hawkins NJ, Ward RL, Hitchins MP. Methylation of the 3p22 region encompassing MLH1 is representative of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2011; 24(3):396–411
- [210] Ding X, Mohd AB, Huang Z, Baba T, *et al.* MLH1 expression sensitises ovarian cancer cells to cell death mediated by XIAP inhibition. *Br J Cancer* 2009; 101(2):269–77
- [211] Wang X, Fan J, Liu D, Fu S. Spreading of Alu methylation to the promoter of the MLH1 gene in gastrointestinal cancer. *PLoS One* 2011; 6(10):e25913
- [212] Mackay HJ, Cameron D, Rahilly M, Mackean MJ, *et al.* Reduced MLH1 expression in breast tumors after primary chemotherapy predicts disease-free survival. *J Clin Oncol* 2000; 18:87–93
- [213] Murata H, Khattar NH, Kang Y, Gu L, *et al.* Genetic and epigenetic modification of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in sporadic breast cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 2002; 21:5696–5703
- [214] Murata H, Khattar NH, Gu L, Li GM. Roles of mismatch repair proteins hMSH2 and hMLH1 in the development of sporadic breast cancer. *Cancer Lett* 2005; 223:143–150
- [215] Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J "BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures". *Genes Dev* 2000; 14(8):927–39
- [216] Wang Y, Qin J. "MSH2 and ATR form a signaling module and regulate two branches of the damage response to DNA methylation". *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(26):15387–92
- [217] Bandipalliam P. Syndrome of Early Onset Colon Cancers, Hematologic Malignancies & Features of Neurofibromatosis in HNPCC Families with Homozygous Mismatch Repair Gene Mutations. *Fam Cancer* 2005; 4(4):323–33
- [218] Cederquist K, Emanuelsson M, Goransson I, Holinski-Feder E, *et al.* Mutation analysis of the MLH1, MSH2 and MSH6 genes in patients with double primary

- cancers of the colorectum and the endometrium: a population-based study in northern Sweden. *Int J Cancer* 2004; 109(3):370-6
- [219] Edelman W, Yang K, Umar A, Heyer J, *et al.* Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility. *Cell* 1997; 91(4):467-77
- [220] Offit K. MSH6 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer: another slice of the pie. *J Clin Oncol* 2004; 22(22):4449-51
- [221] Wasielewski M, Riaz M, Vermeulen J, van den Ouweland A, *et al.* Association of rare MSH6 variants with familial breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 123(2):315-20
- [222] Vahteristo P, Ojala S, Tamminen A, Tommiska J, *et al.* No MSH6 germline mutations in breast cancer families with colorectal and/or endometrial cancer. *J Med Genet* 2005; ;42(4):e22
- [223] Moelans CB, Verschuur-Maes AH, van Diest PJ. Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J Pathol* 2011; 225(2):222-31
- [224] Renkonen E, Zhang Y, Lohi H, Salovaara R, *et al.* Altered expression of MLH1, MSH2, and MSH6 in predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(19):3629-37
- [225] Orbo A, Nilsen MN, Arnes MS, Pettersen I, *et al.* Loss of expression of MLH1, MSH2, MSH6, and PTEN related to endometrial cancer in 68 patients with endometrial hyperplasia. *Int J Gynecol Pathol.* 2003; 22(2):141-8
- [226] Pilz A, Fountain J, Peters J, *et al.* Linkage mapping of the Aldo-2, pax-5, Ambp, and D4h9S3E loci on mouse chromosome 4 in the region of homology with human chromosome 9. *Genomics* 1993; 18:705–708
- [227] Nutt SL, Urbanek P, Rolink A *et al* Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes Dev* 1997; 11:476–491
- [228] Usui T, Wakatsuki Y, Matsunaga Y. *et al* Overexpression of B cell-specific activator

- protein (BSAP/Pax5) in a late B cell is sufficient to suppress differentiation to an Ig high producer with plasma cell phenotype. *J Immunol* 1997; 158:3197–3204
- [229] Gerard M, Abitbol M, Delezoid A L. *et al.* Pax-genes expression during human embryonic development, a preliminary report. *CR Acad Sci III* 1995; 318:57–66
- [230] Schafer BW. Emerging roles of PAX transcription factors in cancer biology. *Gen Physiol Biophys* 1998; 17:211–224
- [231] Kozmik Z, Sure U, Ruedi D, *et al.* Deregulated expression of Pax5 in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:5709–5713
- [232] Baumann Kubetzko F B, di Paolo C, Maag C, *et al.* The pax5 oncogene is expressed in N-type neuroblastoma cells and increases tumorigenicity of S-type cell line. *Carcinogenesis* 2004; 25:1839–1846
- [233] Stuart ET, Kioussi C, Aguzzi A, *et al.* Pax5 expression correlates with increasing malignancy in human astrocytomas. *Clin Cancer Res* 1995; 1:207–214
- [234] Babjuk M, Soukup V, Mares J, *et al.* The expression of pax5, p53 immunohistochemistry and p53 mutation analysis in superficial bladder carcinoma tissue. Correlation with pathological findings and clinical outcome. *Int J Urol Nephrol* 2002; 34:495–501
- [235] Adsheed JM, Ogden CW, Penny MA, *et al.* The expression of Pax5 in human transitional cell carcinoma of the bladder: relationship with de-differentiation. *BJU Int* 1999; 83:1039–1044
- [236] Steinbach J P, Kozmik Z, Pfeffer P. *et al.* Overexpression of pax5 is not sufficient for neoplastic transformation of mouse neuroectoderm. *Int J Cancer* 2001; 93:459–467
- [237] Walther C and Gruss P. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 1991; 113:1435-1449
- [238] Kioussi C, O'Connell S, St-Onge L, Treier M, *et al.* Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:14378-14382
- [239] Dohrmann C, Gruss L and Lemaire L. Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas. *Mech Dev* 2000; 92:47-54

- [240] Osumi N, Shinohara H, Numayama-Tsuruta K and Maekawa M. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells* 2008; 26:1663-1672
- [241] Warren N, Caric D, Pratt T, Clausen JA, *et al.* The transcription factor, Pax6, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex. *Cereb Cortex* 1999; 9:627-635
- [242] Simpson TI and Price DJ. Pax6; a pleiotropic player in development. *Bioessays* 2002; 24:1041-1051
- [243] Zhang J, Lu JP, Suter DM, Krause KH, *et al.* Isoform- and dose-sensitive feedback interactions between paired box 6 gene and delta-catenin in cell differentiation and death. *Exp Cell Res* 2010; 316,1070-1081
- [244] Mascarenhas JB, Young KP, Littlejohn EL, Yoo BK, *et al.* PAX6 is expressed in pancreatic cancer and actively participates in cancer progression through activation of the MET tyrosine kinase receptor gene. *J Biol Chem* 2009; 284:27524-27532
- [245] Hellwinkel OJ, Kedia M, Isbarn H, *et al.* Methylation of the TPEF- and PAX6-promoters is increased in early bladder cancer and in normal mucosa adjacent to pTa tumours. *BJU Int* 2008; 101:753-757
- [246] Zhou YH, Tan F, Hess KR, *et al.* The expression of PAX6, PTEN, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in gliomas: relationship to tumor grade and survival. *Clin Cancer Res* 2003; 9:3369–3375
- [247] Shyr CR, Tsai MY, Yeh S, Kang HY, *et al.* Tumor suppressor PAX6 functions as androgen receptor co-repressor to inhibit prostate cancer growth. *Prostate* 2010; 70, 190-199
- [248] Muratovska A, Zhou C, He S, Goodyer P *et al.* Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. *Oncogene* 2003; 22,7989-7997
- [249] Zong X, Yang H, Yu Y, Zou D, *et al.* Possible role of Pax-6 in promoting breast cancer cell proliferation and tumorigenesis. Source Department of Breast Surgery, Zhejiang Provincial Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China. *BMB Rep* 2011; 44(9):595-600

- [250] Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, *et al.* "Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers". *Nat Genet* 1997; 15(4):356–62
- [251] Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001; 264:29–41
- [252] Mills GB, Lu Y, Fang X, Wang H, *et al.* The role of genetic abnormalities of PTEN and the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in breast and ovarian tumorigenesis, prognosis, and therapy. *Semin Oncol* 2001; 28:125–141
- [253] Nelen MR, van Staveren WC, Peeters EA, Hassel MB, *et al.* Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum Mol Genet* 1997; 6(8):1383–1387
- [254] Carroll BT, Couch FJ, Rebbeck TR, Weber BL. Polymorphisms in PTEN in breast cancer families. *J Med Genet* 1999; 36(2):94–96
- [255] George DJ, Shepard TF, Ma J, Giovannucci E, *et al.* PTEN polymorphism (IVS4) is not associated with risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(4):411–412
- [256] Ge H, Cao YY, Chen LQ, Wang YM, *et al.* PTEN polymorphisms and the risk of esophageal carcinoma and gastric cardiac carcinoma in a high incidence region of China. *Dis Esophagus* 2008; 21:409–415
- [257] Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, *et al.* "Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis". *Nature* 2005; 436(7051):725–30
- [258] Sun SY. "Retinoic acid receptor beta and colon cancer". *Cancer Biol Ther* 2004; 3(1): 87–8
- [259] Wang Q, Yang W, Uytingco MS, Christakos S, *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and all-trans-retinoic acid sensitize breast cancer cells to chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res* 2000; 60:2040–2048
- [260] Moon RC, Constantinou AI. Dietary retinoids and carotenoids in rodent models of mammary tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 46:181–189
- [261] Donato LJ, Noy N. Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid:

- Proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. *Cancer Res* 2005; 65:8193–8199
- [262] Rao GN, Ney E, Herbert RA. Changes associated with delay of mammary cancer by retinoid analogues in transgenic mice bearing c-neu oncogene. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 58:241–254
- [263] Alvarez S, *et al.* Structure, function and modulation of retinoic acid receptor beta, a tumor suppressor. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:1406–1415
- [264] Narayan G, Arias-Pulido H, Koul S, Vargas H, *et al.* Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome. *Mol Cancer* 2003; 13(2):24
- [265] Hayashi K, Yokozaki H, Naka K, Yasui W, *et al.* Overexpression of retinoic acid receptor beta induces growth arrest and apoptosis in oral cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92(1):42-50
- [266] Furuta J, Umebayashi Y, Miyamoto K, Kikuchi K, *et al.* Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. *Cancer Sci* 2004; 95(12):962-8
- [267] Schulz WA, Hoffmann MJ. Epigenetic mechanisms in the biology of prostate cancer. *Semin Cancer Biol* 2009; 19(3):172-80
- [268] Feng Q, Balasubramanian A, Hawes SE, Toure P, *et al.* Detection of hypermethylated genes in women with and without cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2005; 16;97(4):273-82
- [269] Marzese DM, Hoon DS, Chong KK, Gago FE, *et al.* DNA methylation index and methylation profile of invasive ductal breast tumors. *J Mol Diagn* 2012; 14(6):613-22
- [270] Agathangelou A, Cooper WN, Latif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res* 2005; 65:3497–3508
- [271] Dallol A, Cooper WN, Al-Mulla F, Agathangelou A, *et al.* Depletion of the Ras association domain family 1, isoform A-associated novel microtubule-associated protein, C19ORF5/MAP1S, causes mitotic abnormalities. *Cancer Res* 2007; 67:492–500
- [272] Tommasi S, Dammann R, Zhang Z, Wang Y, *et al.* Tumor susceptibility of Rassf1a knockout mice. *Cancer Res* 2005; 65:92–98

- [273] Song MS, Song SJ, Ayad NG, Chang JS, *et al.* The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat Cell Biol* 2004; 6:129–137
- [274] Hesson LB, Cooper WN, Latif F. The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis Markers* 2007; 23:73–87
- [275] Dammann R, Yang G, Pfeifer GP. Hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res* 2001; 61:3105–3109
- [276] Wang J, Wang B, Chen X, Bi J. The prognostic value of RASSF1A promoter hypermethylation in non-small cell lung carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Carcinogenesis* 2010; 32:411–416
- [277] Tanemura A, Terando AM, Sim MS, van Hoesel AQ, *et al.* CpG island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15:1801–1807
- [278] Jo H, Kim JW, Kang GH, Park NH, *et al.* Association of promoter hypermethylation of the RASSF1A gene with prognostic parameters in endometrial cancer. *Oncol Res* 2006; 16:205–209
- [279] Misawa A, Tanaka S, Yagyu S, Tsuchiya K, *et al.* RASSF1A hypermethylation in pretreatment serum DNA of neuroblastoma patients: a prognostic marker. *Br J Cancer* 2009; 100:399–404
- [280] Martins AT, Monteiro P, Ramalho-Carvalho J, Costa VL, *et al.* High RASSF1A promoter methylation levels are predictive of poor prognosis in fine-needle aspirate washings of breast cancer lesions. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 129:1–9
- [281] Kawai Y, Sakano S, Suehiro Y, Okada T, *et al.* Methylation level of the RASSF1A promoter is an independent prognostic factor for clearcell renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2010; 21:1612–1617
- [282] Cho YH, Shen J, Gammon MD, Zhang YJ, *et al.* Prognostic significance of gene-specific promoter hypermethylation in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 131(1):197-205

- [283] Kioulafa M, Kaklamanis L, Mavroudis D, Georgoulas V. Prognostic significance of RASSF1A promoter methylation in operable breast cancer. *Clin Biochem* 2009; 42:970–975
- [284] Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, *et al.* "Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase". *Nature Genetics* 1998; 18(1):38–43
- [285] Sanchez-Cespedes M. "A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz-Jeghers syndrome". *Oncogene* 2007; 26(57):7825–32
- [286] "Distribution of somatic mutations in STK11". *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*. Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge. Retrieved 2009; 11: 11
- [287] Hemminki A, Tomlinson I, Markie D, Jarvinen H, *et al.* Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis. *Nat Genet* 1997; 15:87–90
- [288] Esteller M, Avizienyte E, Corn PG, Lothe RA, *et al.* Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene* 2000; 19:164–168
- [289] Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, *et al.* DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 2001; 10:3001–3007
- [290] Jaffe E, Bornstein P, Disteché CM. Mapping of the thrombospondin gene to human chromosome 15 and mouse chromosome 2 by in situ hybridization. *Genomics* 1990; 7(1):123–6
- [291] Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, *et al.* A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87:6624–6628
- [292] Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol* 1990; 111:765–772
- [293] Lawler J, Detmar M. Tumor progression: the effects of thrombospondin- 1 and -2. *Int*

- J Biochem Cell Biol. 2004; 36:1038–1045
- [294] Isenberg JS, Hyodo F, Ridnour LA, Shannon CS, *et al.* Thrombospondin 1 and Vasoactive Agents Indirectly Alter Tumor Blood Flow^{1,2}. *Neoplasia* 2008; 10(8): 886–896
- [295] Isenberg JS, Ridnour LA, Dimitry J, Frazier WA, *et al.* CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1. *J Biol Chem* 2006; 281:26069–26080
- [296] Maxhimer JB, Soto-Pantoja DR, Ridnour LA, Shih HB, *et al.* "Radioprotection in Normal Tissue and Delayed Tumor Growth by Blockade of CD47 Signaling". *Sci Transl Med* 2009; 1(3):3ra7
- [297] Varani J, Dixit VM, Fligiel SE, McKeever PE, *et al.* Thrombospondin-induced attachment and spreading of human squamous carcinoma cells. *Exp Cell Res* 1986; 167:376–390
- [298] Castle V, Varani J, Fligiel S, Prochownik EV, *et al.* Antisense-mediated reduction in thrombospondin reverses the malignant phenotype of a human squamous carcinoma. *J Clin Invest* 1991; 87:1883–1888
- [299] Weinstat-Saslow DL, Zabrenetzky VS, VanHoutte K, Frazier WA, *et al.* Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Res* 1994; 54:6504–6511
- [300] Streit M, Velasco P, Brown LF, Skobe M, *et al.* Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 1999; 155:441–452
- [301] Nacht M, Ferguson AT, Zhang W, Petroziello JM, Cook BP, Gao YH, Maguire S, Riley D, Coppola G, Landes GM, Madden SL, Sukumar S. Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59:5464–5470
- [302] Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, Bochner BH, Esrig D, Groshen S, Dunn M, Nichols PW, Taylor CR, Skinner DG, Cote RJ. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: Association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor

- progression. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:219–227
- [303] Ohtani Y, Kijima H, Dowaki S, Kashiwagi H, *et al.* Stromal expression of thrombospondin-1 is correlated with growth and metastasis of human gallbladder carcinoma. *Int J Oncol* 1999; 15:453–457
- [304] Apte SS, Mattei MG, Olsen BR. Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22. *Genomics* 1994; 19(1):86–90
- [305] Qi JH, Ebrahem Q, Moore N, Murphy G, *et al.* A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med* 2003; 9(4):407–15
- [306] Span PN, Lindberg RL, Manders P, *et al.* Tissue inhibitors of metalloproteinase expression in human breast cancer: TIMP-3 is associated with adjuvant endocrine therapy success. *J Pathol* 2004; 202:395–402
- [307] Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 2002; 21(14):2245–2252
- [308] Helleman J, Jansen MP, Ruigrok-Ritstier K, Staveren IL, *et al.* Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response. *Clin Cancer Res* 2008; 14(17):5555-64
- [309] Bai YX, Yi JL, Li JF, Sui H. Clinicopathologic significance of BAG1 and TIMP3 expression in colon carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13(28):3883–3885
- [310] Mashkova TD, Oparina Nlu, Zinov'eva OL, Kropotova ES, *et al.* Transcription TIMP3, DAPk1 and AKR1B10 genes in squamous cell lung cancer. *Mol Biol* 2006; 40(6):1047–1054
- [311] Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, *et al.* Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*. 1986; 320(6057):84–5
- [312] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57–70
- [313] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49–53
- [314] Laptenko O, Prives C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ* 2006; 13:951–961

- [315] Mihara MY, Erster S, Zaika A *et al.* p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 2003; 11:577–590
- [316] Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 2001; 15:2177–2196
- [317] Banin S, Moyal L, Shieh S *et al.* Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998; 281:1674–1677
- [318] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991; 253(5015):49–53
- [319] Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide. *Oncogene* 2004; 23:2809–2818
- [320] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, *et al.* Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997; 90(4): 809–19
- [321] Kaelin WG. The emerging p53 gene family. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(7):594–8
- [322] Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, *et al.* The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci* 2000; 113(10):1661–70
- [323] Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, *et al.* An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* 2000; 289(5477):304–6
- [324] Dobbstein M, Strano S, Roth J, Blandino G. p73-induced apoptosis: a question of compartments and cooperation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331(3):688–93
- [325] Cai Y, Qiu S, Gao X, Gu SZ, *et al.* iASPP inhibits p53-independent apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p63/p73 on promoters of proapoptotic gene, *Apoptosis* 2012; 17:777–783
- [326] Nimura Y, Mihara M, Ichimiya S, Sakiyama S, *et al.* p73, a gene related to p53, is not mutated in esophageal carcinomas. *Int J Cancer* 1998; 78(4):437–40
- [327] Nomoto S, Haruki N, Kondo M, Konishi H, *et al.* Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers. *Cancer Res.* 1998; 58(7):1380–3

- [328] Mihara M, Nimura Y, Ichimiya S, Sakiyama S, *et al.* Absence of mutation of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 79(1):164-7
- [329] Yang A, Walker N, Bronson R, *et al.* p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 2000; 404(6773):99–103
- [330] Conforti F, Yang AL, Agostini M, Rufini A, *et al.* Relative expression of TAp73 and Np73 isoforms. *Aging* 2012; 4(3):202-5
- [331] Sayan AE, Sayan BS, Findikli N, Ozturk M. Acquired expression of transcriptionally active p73 in hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 2001; 20:5111–5117
- [332] Hofstetter G, Berger A, Chamson M, Müller-Holzner E, *et al.* Clinical relevance of TAp73 and Δ Np73 protein expression in ovarian cancer: a series of 83 cases and review of the literature. *Int J Gynecol Pathol* 2011; 30(6):527-31
- [333] Goldschneider D, Blanc E, Raguénez G, Barrois M. Differential response of p53 target genes to p73 overexpression in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 2):293-301
- [334] Li J, Jiang X, Zhou X. Expression and prognosis significance of p73 and PCNA in laryngeal squamous cell carcinoma. [Article in Chinese] *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 2005; 19(24):1121-4
- [335] Uramoto H, Sugio K, Oyama T, Nakata S. Expression of the p53 family in lung cancer. *Anticancer Res* 2006; 26(3A):1785-90
- [336] Hong SM, Cho H, Moskaluk CA, Yu E. p63 and p73 expression in extrahepatic bile duct carcinoma and their clinical significance. *J Mol Histol* 2007; 38(3):167-75
- [337] Cuadros M, Ribas G, Fernández V, Rivas C, *et al.* Allelic expression and quantitative RT-PCR study of TAp73 and Δ Np73 in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Res* 2006; 30(2):170-7
- [338] Sahu GR, Mishra R, Nagpal JK, Das BR. Alteration of p73 in acute myelogenous leukemia. *Am J Hematol* 2005; 79(1):1-7
- [339] Uramoto H, Sugio K, Oyama T, Nakata S. Expression of Δ Np73 predicts poor prognosis in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(20):6905-11

- [340] Guan M, Peng HX, Yu B, Lu Y. Overexpression and angiogenesis in human colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33(5):215-20
- [341] Stiewe T, Pützer BM. Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? *Cell Death Differ* 2002; 9(3):237-45
- [342] Marabese M, Vikhanskaya F, Broggin M. p73: a chiaroscuro gene in cancer. *Eur J Cancer* 2007; 43(9):1361-72
- [343] Jacobs WB, Walsh GS, Miller FD. Neuronal survival and p73/p63/p53: a family affair. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 2005; 10(5):443-55
- [344] Wang AM, Doyle MY, and Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:9717-9721
- [345] Nolan T, Hands RE, Bustin SA . "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR". *Nat Protoc* 2006; 1(3):1559-1582
- [346] Chiang PW, Song WJ, Wu KY, Korenberg JR, *et al.* Use of a fluorescent-PCR reaction to detect genomic sequence copy number and transcriptional abundance. *Genome Res* 1996; 6:1013-1026
- [347] Gibson UE, Heid CA, and Williams PE. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996; 6:995-1001
- [348] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, and Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 1993; 11:1026-1030
- [349] Magic Z, Radulovic S, Brankovic-Magic M. "cDNA microarrays: identification of gene signatures and their application in clinical practice". *J BUON* 12 Suppl 2007; 1: S39-44
- [350] Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. Statistical analysis of real-time PCR data *BMC Bioinformatics* 2006; 7:85
- [351] Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Mol Med* 2002; 8:257-260
- [352] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays *Mol Endocrinol* 2000; 25:169-93
- [353] Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, *et al.* Quantitative real-time PCR: a powerful

- ally in cancer research. Trends in Mol Med 2003; 9:189-195
- [354] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res 1996; 6:986-994
- [355] Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol. 1990; 28(3):495-503
- [356] Segal, Irwin. Biochemical Calculations (2nd Edition). John Wiley and Sons, 1976.
- [357] Comparison of two different detection techniques for DNA quantification: Absorbance vs. Fluorescence. Tecan, Inc. July, 2000
- [358] Gerard GF, Fox DK, Nathan M, D'Alessio JM. Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. Mol Biotechnol 1997; 8(1):61-77
- [359] Doherty PJ, Huesca-Contreras M, Dosch HM, Pan S. Rapid amplification of complementary DNA from small amounts of unfractionated RNA. Anal Biochem. 1989; 15;177(1):7-10
- [360] Helms, Volkhard. "Fluorescence Resonance Energy Transfer". Principles of Computational Cell Biology. Weinheim: Wiley-VCH 2008; p 202
- [361] Nazarenko I, Lowe B, Darfler M, Ikonomi P, *et al.* Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. Nucleic Acids Res 2002; 30(9):e37.
- [362] Universal Probe Library, ürün broşürü. Roche Applied Sciences, Roche Diagnostics GmbH, 2005. Mannheim, Germany
- [363] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230:1350-1354
- [364] Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res 1996; 6:995-1001
- [365] Colin CA, Windmeijer A, Frank AG, Gramajo H, *et al.* "An R-squared measure of goodness of fit for some common nonlinear regression models". Journal of Econometrics 1997; 77 (2):1790–2
- [366] Souza1ACMF, Souza1 DRV, Sanabani SS, Giorgi RR. The performance of semi-

- quantitative differential PCR is similar to that of real-time PCR for the detection of the MYCN gene in neuroblastomas. *Med Biol Res* 2009; 42(9):791-795
- [367] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR *Nucl Acids Res* 2001; 29:2002-2007
- [368] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001; 25:402-408
- [369] Jacques BK, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, *et al.* Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Laboratory Investigation* 2005; 85:154–159
- [370] Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, Poppe B, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002; 3:7
- [371] Andersen CL. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets 2004; 64:5245-5250
- [372] Pleil JD, Stiegel MA, Madden MC, Sobus JR. Heat map visualization of complex environmental and biomarker measurements.. *Chemosphere* 2011; 84(5):716-23
- [373] R. Rajaram S, Oono Y. NeatMap--non-clustering heat map alternatives. *BMC Bioinformatics*. 2010; 22; 11:45
- [374] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349:2042-54
- [375] Weber M, Hellmann I, Stadler MB, *et al.* Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 2007; 39:457-66
- [376] Widschwendter M, Jones PA. DNA Methylation and Breast Carcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21:5462-5482
- [377] Lehmann U, Langer F, *et al.* Quantitative Assessment of Promoter hypermethylation during breast cancer development. *AJP* 2002; 160(2):605-612
- [378] Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. DNA Methylation: An Alternative Pathway to Cancer. *Annals of Surgery* 2001; 234:10-20

- [379] Esteller M, Corn PG, Baylin SB, *et al.* A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3225-9
- [380] Schouten JP, *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification *Nucleic Acids Res* 2002; 30:e57
- [381] Anders OHN, Najim A, Helena MBD, Raymon NCPV, *et al.* Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(14):128
- [382] Marinus MG, Morris NR. Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1973; 114(3):1143–1150
- [383] Siegfried Z and Cedar H. DNA methylation: a molecular lock. *Current Biology*. 1997; 7:R305-307
- [384] Optimizing MLPA fragment separation, MRC Holland, 2009, Amsterdam, The Netherlands
- [385] MS-MLPA DNA Methylation Quantification Protocol, MRC Holland, 2009, Amsterdam, The Netherlands
- [386] Beckman Coulter, Fullerton CA. CEQ8000, User's Guide. 2004; 230-243
- [387] Geisser S, Johnson WM. *Modes of Parametric Statistical Inference*, John Wiley & Sons, 2006
- [388] DR Cox. *Principles of Statistical Inference*, Cambridge University Press, 2006
- [389] Freedman D. *Statistical Models: Theory and Practice*, Cambridge University Press, 2000
- [390] Corder GW, Foreman DI. *Nonparametric Statistics for Non-Statisticians: A Step-by-Step Approach*. Wiley 2009
- [391] Fisher, R.A. *Statistical Methods for Research Workers* . Oliver and Boyd, 1925
- [392] Lindman,H.R. *Analysis Of Variance in Complex Experimental Designs*. San Francisco: W. H. Freeman & Co 1974
- [393] Casson R J , The pesty P value. *Clinical & Experimental Ophthalmology* 2011; 39: 849–850
- [394] Spearman C. "The proof and measurement of association between two things". *Amer*

- J Psychol. 1904; 15:72–101
- [395] Jmp For Basic Univariate And Multivariate Statistics: A Step-by-step Guide. Ann Lehman
- [396] Mann HB, Whitney DR. "On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other". *Annals of Mathematical Statistics* 1947; 18(1):50–60
- [397] Plackett RL. "Karl Pearson and the Chi-Squared Test". *International Statistical Review (International Statistical Institute (ISI))* 1983; 51(1):59–72
- [398] Kruskal W, Wallis WA. "Use of ranks in one-criterion variance analysis", *Journal of the American Statistical Association* 1952; 47(260):583–621
- [399] van der Laan MJ, Pollard KS. A new algorithm for hybrid hierarchical clustering with visualization and the bootstrap. *J Stat Plann Infer* 2003; 117(2):275-303
- [400] Krzanowski WY. *Principles of Multivariate Analysis*. *Technometrics* 2001; 43(4):498-498
- [401] URL: www.phgfoundation.org/news/3964/ erişim tarihi 07.12.2012
- [402] Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, *et al.* Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist* 2006; 11(8):868-77
- [403] Goetz MP, Suman VJ, Ingle JN *et al.* A two-gene expression ratio of ho meobox 13 and interleukin-17B receptor for prediction of recurrence and survival in women receiving adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res* 2006; 12:2080 –2087
- [404] Wang Z, Dahiya S, Provencher H, Muir B, *et al.* The prognostic biomarkers HOXB13, IL17BR, and CHDH are regulated by estrogen in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13:6327– 6334
- [405] Ma XJ, Hilsenbeck SG, Wang W *et al.* The HOXB13:IL17BR expression index is a prognostic factor in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:4611– 4619
- [406] Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, *et al.* A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 2004; 5:607– 616
- [407] Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:2817–2826

- [408] Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, *et al.* Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:3726-3734
- [409] Sparano JA. TAILORx: trial assigning individualized options for treatment (Rx). *Clin Breast Cancer* 2006; 7:347–350
- [410] Van't Veer LJ, Dai H, Van de Vijver MJ, He YD, *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415:530-536
- [411] Bogaerts J, Cardoso F, Buyse M, Braga S, *et al.* Gene signature evaluation as a prognostic tool: Challenges in the design of the MINDACT trial. *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 3:540 –551
- [412] Cardoso F, Piccart-Gebhart M, Van't Veer L *et al.* The MINDACT trial: the first prospective clinical validation of a genomic tool. *Mol Oncol* 2007; 1(3):246-51
- [413] Buyse M, Loi S, Van't Veer L, *et al.* Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:1183–1192
- [414] Habel LA, Shak S, Jacobs MK, Capra A, *et al.* A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res* 2006; 8:R25
- [415] Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, *et al.* American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5287–5312
- [416] Çelebiler Çavusoglu A, Saydam S, Alakavuklar M, Canda T, *et al.* A pilot study for human tumor/DNA banking: returned more questions than answers. *Med Oncol* 2008; 25:471–473
- [417] McNeill RE, Miller N, Kerin MJ. Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. *BMC Mol Biol* 2007; 27(8):107
- [418] Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, *et al.* Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med* 2005; 83(12):1014-24

- [419] Kwok S and Higuchi R. Avoiding false positive with PCR. *Nature* 1989; 339:237- 238
- [420] Lee S, Sayin A, Grice S, Burdett H, *et al.* Genome-Wide Expression Analysis of a Spinal Muscular Atrophy Model: Towards Discovery of New Drug Targets. *PLoS ONE*, 2008; 3(1):e1404
- [421] Goni R, García P and Foissac S. The qPCR data statistical analysis. *Integromics White Paper - September 2009*
- [422] Hess J, Errami A, Berkhof J, Denkers F, *et al.* Concurrent methylation of promoters from tumor associated genes predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 2008; 49(6):1132 – 1141
- [423] Du P, Zhang X, Huang CC, Jafari N, *et al.* Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarrayanalysis. *BMC Bioinformatics* 2010; 11:587
- [424] Jeuken JW, Cornelissen SJ, Vriezen M, Dekkers MM, *et al.* MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab Invest* 2007; 87(10):1055-65
- [425] Buyru N, Altinisik J, Ozdemir F, Demokan S, *et al.* Methylation Profiles in Breast Cancer. *Cancer Investigation* 2009; 27:307–312
- [426] Tekgöl N, Saltık D, Şen Y, Kurt S. Menarche Age in Women of 15-49 Ages, *Sted* 2005; 14(4):76
- [427] Esin MN, Bulduk S. Kadın sağlığı geliştirme programı: Halk sağlığı hemşireliği uygulaması. *Sted* 2004; 3(17):246-248
- [428] Hendricks, Walter AR, Kate W. The Sampling Distribution of the Coefficient of Variation. *The Annals of Mathematical Statistics* 1936; 7(3):129–32
- [429] Tarca AL, Romero R, Draghici S. Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195(2):373-388
- [430] Everitt BS. Principles of Multivariate Analysis. *Journal of the Royal Statistical Society* 1989; A152(2):264-265
- [431] Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A: Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005; 6:279-284
- [432] Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription

- polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25:169-193
- [433] Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, *et al.* Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Invest* 2005; 85:1040-1050
- [434] Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, *et al.* Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* 2002; 309:293-300
- [435] Lyng MB, Laenkholm AV, Pallisgaard N, Ditzel HJ. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. *BMC Cancer* 2008; 8:20
- [436] Kılıç Y, Çelebiler A, Sakızlı M. Identification of the reference genes for normalization of Quantitative PCR Data in breast cancer. *Turk J Biochem* 2012 (basımda)
- [437] Singh AK, Elvitigala T, Bhattacharyya-Pakrasi M, Aurora J, *et al.* Integration of Carbon and Nitrogen Metabolism with Energy Production Is Crucial to Light Acclimation in the Cyanobacterium *Synechocystis*. *Plant Physiol* 2008; 148(1):467-478
- [438] Mühlbauer M, Langenbach N, Stolz W, *et al.* Detection of Melanoma Cells in the Blood of Melanoma Patients by Melanoma-inhibitory Activity (MIA) Reverse Transcription-PCR. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1099-1105
- [439] Mestdagh P, Van Vlierberghe P, An De Weer, Muth D, *et al.* A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biology* 2009; 10:R64
- [440] Ranganathan P, Agrawal L, Bhushan R, Chavalmane AK, *et al.* Expression profiling of genes regulated by TGF-beta: Differential regulation in normal and tumour cells. *BMC Genomics* 2007; 8:98
- [441] Jalali GR, Vorstman JAS, Errami A, Vijzelaar R, *et al.* Detailed Analysis of 22q11.2 With a High Density MLPA Probe Set. *Hum Mutat* 2008; 29(3):433-440
- [442] Suijkerbuijk KPM, Pan X, van der Wall E, van Diest PJ, *et al.* Comparison of different promoter methylation assays in breast cancer. *Analytical Cellular Pathology / Cellular Oncology* 2010; 33:133-141

- [443] Castro M, Grau L, Puerta P, Gimenez L, *et al.* Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in lung cancer. *Journal of Translational Medicine* 2010; 8:86
- [444] Gylling A, Abdel-Rahman WM, Juhola M, Nuorva K, *et al.* Is gastric cancer part of the tumour spectrum of hereditary non-polyposis colorectal cancer? A molecular genetic study. *Gut* 2007; 56:926–933
- [445] Marzese DM, Gago FE, Vargas-Roig LM, Roqué M. Simultaneous analysis of the methylation profile of 26 cancer related regions in invasive breast carcinomas by MS-MLPA and drMS-MLPA. *Molecular and Cellular Probes* 2010; 24:271-280
- [446] Lodish H, Berk A, Zipursky SL, *et al.* *Molecular Cell Biology*. 4th edition. W. H. Freeman, New York, 2000; Bölüm 10.4
- [447] Kurozumi K, Nakao K, Nishida T, Nakahara M, *et al.* Significance of biologic aggressiveness and proliferating activity in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 1998; 22:1237–42
- [448] de Alava E, Panizo A, Sola I, Rodriguez-Rubio FI, *et al.* CD44v6 expression is related to progression in renal epithelial tumours. *Histopathology* 1998; 33:39–45
- [449] Bankfalvi A, Terpe HJ, Breukelmann D *et al.* Immunophenotypic and prognostic analysis of E-cadherin and β -catenin expression during breast carcinogenesis and tumour progression: a comparative study with CD44. *Histopathology* 1999; 34:25–34
- [450] Kanke M, Fujii M, Kameyama K *et al.* Role of CD44 variant exon 6 in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126:1217–23
- [451] Sillanpa S, Anttila MA, Voutilainen K *et al.* CD44 expression indicates favorable prognosis in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(14): 5318–24.
- [452] Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I *et al.* A multivariate analysis of adhesion molecules expression in assessment of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2007; 95:652–62
- [453] Yu Q, Toole BP, Stamenkovic I. Induction of apoptosis of metastatic mammary carcinoma cells in vivo by disruption of tumor cell surface CD44 function. *J Exp Med* 1997; 186:1985–96.
- [454] Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44, structure, function, and association with the

- malignant process. *Adv Cancer Res* 1997; 71: 241–319
- [455] Colditz GA, Rosner BA, Chen WY, Holmes MD, *et al.* Risk factors for breast cancer according to estrogen and progesterone receptor status. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:218–281
- [456] Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1998; 339:974–84
- [457] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365:1687–717
- [458] Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR *et al.* Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) Multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol* 2005; 23:5108–16
- [459] Francis G, Beadle G, Thomas S, Mengersen K, *et al.* Evaluation of estrogen and progesterone receptor status in HER-2 positive breast carcinomas and correlation with outcome. *Pathology* 2006; 38:391–8
- [460] Ye B, Wang X, Yang Z, Sun Z, *et al.* p53 and p73 Expression in Esophageal Carcinoma Correlate with Clinicopathology of Tumors. *Hepatogastroenterology*, 2012;59(119).
- [461] Dominguez G, Silva JM, Silva J, Garcia JM, *et al.* Wild type p73 overexpression and high-grade malignancy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2001, 66:183–190.
- [462] Yokomizo A, Mai M, Tindall DJ, Cheng L, *et al.* Overexpression of the wild type p73 gene in human bladder cancer. *Oncogene* 1999,18:1629–1633.
- [463] Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene* 2002, 21:5462–5482.
- [464] Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S, Shivakumar L, *et al.* Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93:691– 699.
- [465] Muller HM, Widschwendter A, Fiegl, H, Ivarsson, L, *et al.* DNA methylation in serum of breast cancer patients. An independent prognostic marker. *Cancer Res* 2003, 63:7641–7645.
- [466] Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez de Caceres I, Al-Saleem T, *et al.* Tumor suppressor gene

- promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004, 10:6189– 6193.
- [467] Stearns V, Zhau Q, Davidson NE. Epigenetic regulation as a new target for breast cancer therapy. *Cancer Invest* 2007, 25:659– 665.
- [468] Dammann R, Yang, G, Pfeifer GP. Hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res* 2001, 61:3105– 3109.
- [469] Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, Garret E, et al. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2, and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int J Cancer* 2003, 107:970–975.
- [470] Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, et al. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* 1998, 58:4515–4518.
- [471] Chen KM, Stephen JK, Raju U, Worsham MJ. Delineating an Epigenetic Continuum for Initiation, Transformation and Progression to Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2011,3(2):1580–1592.
- [472] Agundez M, Grau L, Palou J, Algaba F. Evaluation of the methylation status of tumour suppressor genes for predicting bacillus Calmette-Guérin response in patients with T1G3 high-risk bladder tumours. *Eur Urol* 2011,60(1):131-40.
- [473] Tapia T, Smalley SV, Kohen P, Muñoz A, et al. Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors. *Epigenetics* 2008,3(3):157-63.
- [474] Miyamoto K, Fukutomi T, Asada K, Wakazono K, et al. Promoter hypermethylation and post-transcriptional mechanisms for reduced BRCA1 immunoreactivity in sporadic human breast cancers. *Jpn J Clin Oncol* 2002,32(3):79-84.
- [475] Mirza S, Sharma G, Prasad CP, Parshad R, et al. Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ERalpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci* 2007,81(4):280-7.

- [476] Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL, et al. Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nat Genet* 1995,9(4):444-50.
- [477] Wang YQ, Yan Q, Zhang JR, Li SD, et al. Epigenetic inactivation of BRCA1 through promoter hypermethylation in ovarian cancer progression. *J Obstet Gynaecol Res* 2012.
- [478] Scardocci A, Guidi F, D'Alo' F, Gumiero D, et al. Reduced BRCA1 expression due to promoter hypermethylation in therapy-related acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer* 2006,95(8):1108-13.
- [479] Baldwin RL, Nemeth E, Tran H, Shvartsman H, et al. BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Res* 2000,60(19):5329-33.
- [480] Lia J, Zhac XM, Wanga R, Lia XD. Regulation of CD44 expression by tumor necrosis factor- α and its potential role in breast cancer cell migration. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2012,66:144-150
- [481] Joensuu H, Klemi PJ, Toikkanen S, Jalkanen S. Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. *Am J Pathol* 1993,143(3):867-74.
- [482] Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res* 2006,12:5615-5621.
- [483] Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, et al. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res* 2005,11:1154-1159.
- [484] Montgomery N, Hill A, McFarlane S, Neisen J, et al. CD44 enhances invasion of basal-like breast cancer cells by upregulating serine protease and collagen-degrading enzymatic expression and activity. *Breast Cancer Research* 2012,14:R84
- [485] Loredo-Pozos G, Chiquete E, Ocegüera-Villanueva A, Panduro A, et al. Expression profile of BRCA1 and BRCA2 genes in premenopausal Mexican women with breast cancer: clinical and immunohistochemical correlates. *Med Oncol* 2009;26(3):269-75.
- [486] Li J, Zhu H, Chen T, Dai G, et al. TGF- β 1 and BRCA2 expression are associated with

- clinical factors in breast cancer. *Cell Biochem Biophys*. 2011,60(3):245-8.
- [487] Egawa C, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, et al. High BRCA2 mRNA expression predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2002,98(6):879-82.
- [488] Egawa C, Miyoshi Y, Taguchi T, et al. Quantitative analysis of BRCA1 and BRCA2 mRNA expression in sporadic breast carcinomas and its relationship with clinicopathological characteristics. *Jpn J Cancer Res* 2001,92:624–30.
- [489] Egawa C, Miyoshi Y, Takamura Y, Taguchi T, et al. Decreased expression of BRCA2 mRNA predicts favorable response to docetaxel in breast cancer. *Int J Cancer* 2001,95(4):255-9.
- [490] Promkan M, Liu G, Patmasiriwat P, Chakrabarty S. BRCA1 suppresses the expression of survivin and promotes sensitivity to paclitaxel through the calcium sensing receptor (CaSR) in human breast cancer cells. *Cell Calcium* 2011,49(2):79-88.
- [491] Nakai K, Mitomi H, Alkam Y, Arakawa A, et al. Predictive value of MGMT, hMLH1, hMSH2 and BRCA1 protein expression for pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in basal-like breast cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2012,69(4):923-930.
- [492] Rakha EA, El-Sheikh SE, Kandil MA, El-Sayed ME. Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Hum Pathol* 2008,39(6):857-65.
- [493] Ansquer Y, Mandelbrot L, Lehy T, Salomon L, et al. Expression of BRCA1, HER-1 (EGFR) and HER-2 in sporadic breast cancer and relationships to other clinicopathological prognostic features. *Anticancer Res*. 2005,25(6C):4535-41.
- [494] Amirrad M, Al-Mulla F, Varadharaj G, John B. BRCA1 gene expression in breast cancer in Kuwait: correlation with prognostic parameters. *Med Princ Pract* 2005,14(2):67-72.
- [495] Lee WY. Frequent loss of BRCA1 nuclear expression in young women with breast cancer: an immunohistochemical study from an area of low incidence but early onset. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002,10(4):310-5.
- [496] Margeli M, Cirauqui B, Castella E, Tapia G, et al. The prognostic value of BRCA1 mRNA expression levels following neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *PLoS One* 2010,5(3):e9499.

- [497] Kim HJ, Kim MJ, Ahn SH, Son BH, et al. Different prognostic significance of CD24 and CD44 expression in breast cancer according to hormone receptor status. *Breast* 2011,20(1):78-85.
- [498] Roldán G, Delgado L, Musé IM. Tumoral expression of BRCA1, estrogen receptor alpha and ID4 protein in patients with sporadic breast cancer. *Cancer Biol Ther* 2006,5(5):505-10.
- [499] Kim C, Tang G, Pogue-Geile KL, Costantino JP, et al. Estrogen receptor (ESR1) mRNA expression and benefit from tamoxifen in the treatment and prevention of estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Nov 1;29(31):4160-7
- [500] Ferguson AT, Lapidus RG, Baylin SB, Davidson NE. Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression. *Cancer Res* 1995,55:2279-2283.
- [501] Anne Sappok1 and Ulrich Mahlknecht. Ribavirin restores ESR1 gene expression and tamoxifen sensitivity in ESR1 negative breast cancer cell lines. *Clin Epigenetics* 2011;3(1):8.
- [502] Fabianowska-Majewska K, Duley JA, Simmonds HA. Effects of novel anti-viral adenosine analogues on the activity of S-adenosylhomocysteine hydrolase from human liver. *Biochem Pharmacol* 1994,48:897-903.
- [503] Yamamoto N, Nakayama T, Kajita M, Miyake T, et al. Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RAR β 2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay. *Breast Cancer Res Treat* 2012,132(1):165-73.
- [504] Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, Hansen NM, et al. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. *Clin Cancer Res*. 2005,11(6):2156-62.
- [505] Lasabova Z, Tilandyova P, Kajo K, Zubor P. Hypermethylation of the GSTP1 promoter region in breast cancer is associated with prognostic clinicopathological parameters. *Neoplasma* 2010,57(1):35-40.
- [506] Miyake T, Nakayama T, Naoi Y, Yamamoto N, et al. GSTP1 expression predicts poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in ER-negative breast

- cancer. *Cancer Sci* 2012,103(5):913-20.
- [507] Fujita N, Nakayama T, Yamamoto N, Kim SJ, et al. Methylated DNA and total DNA in serum detected by one-step methylation-specific PCR is predictive of poor prognosis for breast cancer patients. *Oncology* 2012,83(5):273-82.
- [508] Hoque MO, Feng Q, Toure P, Dem A, et al. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncol* 2006,24(26):4262-9.
- [509] Krassenstein R, Sauter E, Dulaimi E, Battagli C, et al. Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation. *Clin Cancer Res* 2004,10(1):28-32.

VIII. EKLER

- EK 1. Etik kurul onay yazısı
- EK 2. Etik kurul isim değişikliği onay yazısı
- EK 3. Rölatif gen ekspresyon kantitasyonlarında kullanılacak normalizasyon faktörleri
- EK 4. Referans genlere göre normalize edilmiş gerçek zamanlı PCR verileri
- EK 5. RT-PCR verilerinde genler arasındaki ilişki (korelasyon analizi r değerleri).
- EK 6. DNA konsantrasyon ve saflık değerleri
- EK 7. 22T çalışmasına ait işlenmiş fragman analizi elektroferogram
- EK 8. 22T/m çalışmasına ait işlenmiş fragman analizi elektroferogram
- EK 9. 23T çalışmasına ait işlenmiş fragman analizi elektroferogram
- EK 10. 23T/m çalışmasına ait işlenmiş fragman analizi elektroferogram
- EK 11. 56T çalışmasına ait işlenmiş fragman analizi elektroferogram
- EK 12. 56T/m çalışmasına ait işlenmiş fragman analizi elektroferogram
- EK 13. 22T çalışmasına ait fragman analizi pik değerleri listesi
- EK 14. 22T/m çalışmasına ait fragman analizi pik değerleri listesi
- EK 15. mMLPA fragman büyüklükleri (ME001, kesilmemiş DNA)
- EK 16. mMLPA fragman büyüklükleri (ME001, HhaI ile kesilmiş DNA)
- EK 17. mMLPA fragman büyüklükleri (ME002, kesilmemiş DNA)
- EK 18. mMLPA fragman büyüklükleri (ME002, HhaI ile kesilmiş DNA)
- EK 19. Normalizasyon sonrası metilasyon beta skorları (%)
- EK 20. Kategorize beta skorları
- EK 21. Aynı gene ait birden fazla bölge çalışılan durumlarda metilasyon bulguları
- EK 22. MLPA-01 verilerinde genler arasındaki ilişki (korelasyon analizi r değerleri)
- EK 23. MLPA-02 verilerinde genler arasındaki ilişki (korelasyon analizi r değerleri)
- EK 24. RT-qPCR verileriyle gerçekleştirilen ANOVA testlerine ilişkin p-değerleri
- EK 25. mMLPA-01 verileriyle gerçekleştirilen ANOVA testlerine ilişkin p değerleri
- EK 26. mMLPA-02 verileriyle gerçekleştirilen ANOVA testlerine ilişkin p değerleri
- EK 27. Özgeçmiş
- EK 28. Tezden Yapılan Yayın



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
Tarih ve Sayı: 06.04.2006/88

Etik Kurul Üyeleri

Prof. Dr. Taner ÇAMSARI
Prof. Dr. Cem Şeref BEDİZ
Prof. Dr. Uğur MUNGAN
Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL
Doç. Dr. Arzu SAYINER
Prof. Dr. Özgül SAĞOL
Prof. Dr. Görsev YENER
Doç. Dr. Mustafa SEÇİL
Yard. Doç. Dr. Cenk ERDAL
Yunus KARSLI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 06 Nisan 2006 tarih ve 06/06/06 no.lu toplantısında 38/2006 Protokol Numaralı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Meral SAKIZLI'nın sorumlu olduğu, "Meme tümörlerinde GSTP1, p16 BRCA1, e Cadherin VE TİMP-3 genlerinin epigenetik değişimi ve evrelendirme ilişkisi." isimli çalışmanın uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurulu Başkanı

Etik Kurul Sekreteri
Yonca YILDIRIM

Tel: 0232 412 22 54

EK 2. Etik kurul isim değişikliği onay yazısı

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2012/36-07	Tarih: 08.11.2012
	DEU Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulunun 06.04.2006/88 tarih ve sayı ile onayladığı Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D öğretim üyelerinden Prof.Dr.Meral Sakızlı'nın sorumlusu olduğu "Meme Tümörlerinde GSTP1, p16, BRCA1, e-Cadherin ve TIMP3 Genlerinin Epigenetik Değişimi ve Evrelendirme ile İlişkisi" isimli klinik araştırma adının çalışmanın içeriğinde ve yönteminde bir değişiklik olmaması koşuluyla "Meme Kanseri Olgularında İlişkili Tümör Süpresör Genlerin Metilasyon ve Ekspresyon Durumlarının Karşılaştırılması" olarak değiştirilmesi etik kurulumuzca uygun bulunmuştur.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
---------------	---

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
				E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Banu</i>
Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Osman</i>
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Ş.Reyhan</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Hüseyin</i>
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Vesile</i>
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Bilgin</i>
Doç.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Nihal</i>
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>M.Özdemir</i>
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Ayşe</i>
Doç.Dr.İşıl TEKMEN	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Katılmadı</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BILGIN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Katılmadı</i>
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>İhsan</i>

EK 3. Rölatif gen ekspresyon kantitasyonlarında kullanılacak normalizasyon faktörleri

Örnek	Normalizasyon	Örnek	Normalizasyon	Örnek	Normalizasyon	Örnek	Normalizasyon
22N	1,4061	28N	0,4693	53T	1,2246	61T	0,4833
22T	15,1866	28T	0,1613	54T	3,3278	62N	1,0017
23N	0,7235	29N	0,4936	55T	1,7045	62T	0,0191
23T	0,0308	29T	1,5805	56T	1,5323	63T	0,0932
24N	0,2448	30N	0,3434	57T	2,9618	64N	0,0318
24T	7,8534	30T	0,0687	58N	0,0738	64T	0,7947
25N	1,3163	31N	3,5727	58T	1,9485	N1	0,5886
25T	11,0205	31T	2,2173	59N	0,0242	N2	0,8548
26N	0,0481	32N	21,2655	59T	2,0789	N3	2,1756
26T	5,6585	32T	5,1469	60N	0,0651	N4	0,4824
27N	0,9718	50T	2,1933	60T	2,3411		
27T	6,2002	52T	4,3023	61N	0,0337		

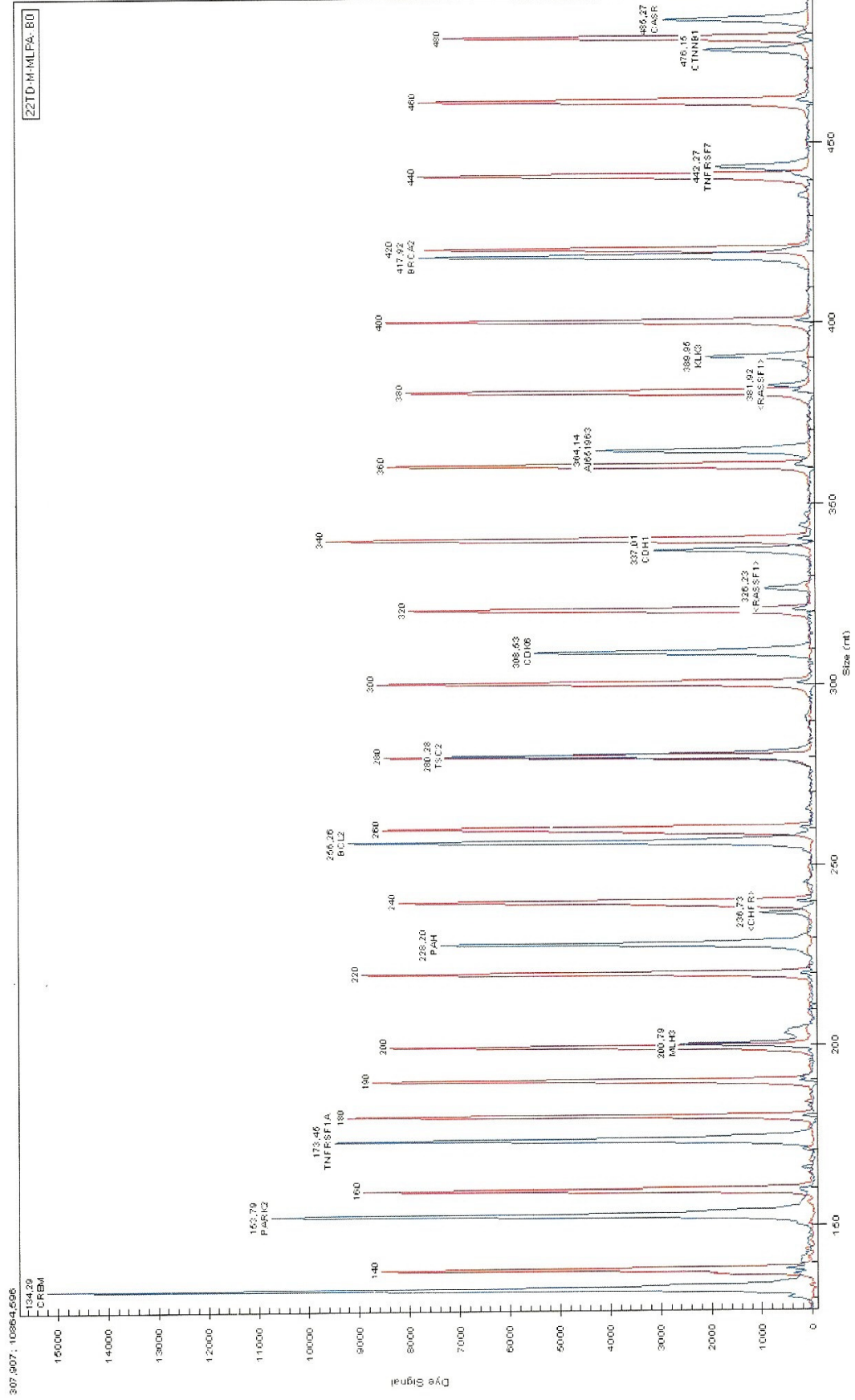
EK 4. Referans genlere göre normalize edilmiş gerçek zamanlı PCR verileri

	22T	23T	24T	25T	26T	29T	30T	31T	32T	50T	52T	54T	55T	56T	58T	60T	61T	62T	64T	66B	22N	31N	61N	62N	64N	NR1	NR2	NR3	
ATM	5,33	-1,35	1,75	7,21	-6,70	-5,39	-6,70	-1,41	-17,51	-40,22	-38,72	-18,64	2,10	-3,75	-17,82	-1,85	11,43	-20,82	-35,02	1,11	-12,04	-2,22	-83,58	1,59	-7,84	1,00	1,00	1,01	1,01
BRCA1	-0,05	-64,00	-27,19	-53,82	-56,69	-25,90	-45,89	-16,68	-61,82	-43,87	-84,74	-54,95	-18,90	-36,00	-22,39	-77,17	-48,84	1,22	-84,16	1,35	-30,38	-5,60	-46,53	-2,08	-48,17	1,00	1,01	1,01	1,01
BRCA2	-27,47	58,49	-17,27	-33,83	-40,22	-9,65	-35,38	-11,47	-15,89	-19,36	84,74	-38,99	-11,08	-25,02	-19,03	65,12	-20,82	-2,10	61,82	1,04	-4,56	-1,12	-6,80	2,69	-3,48	1,00	-1,01	-1,05	1,09
CASP8	1,97	-13,98	1,33	2,17	-1,38	-1,13	-5,74	-1,68	-2,30	-3,26	1,09	-1,77	2,01	-4,92	-1,05	-15,09	18,38	-27,38	-21,63	1,05	-5,98	-1,74	-63,56	-1,97	1,12	1,00	-1,08	1,09	1,09
CD44	29,96	2,38	3,93	4,24	1,86	-3,16	-1,74	4,17	5,88	15,09	71,76	5,22	4,32	2,38	7,04	6,32	0,00	-7,86	29,65	-1,02	1,09	1,42	-4,42	1,15	5,86	1,00	-1,03	-1,01	1,01
CDH13	-6,85	-22,63	1,56	6,19	-9,06	-15,35	-20,18	-3,80	-25,19	1,24	-110,66	-47,67	1,75	1,03	5,54	-8,40	30,59	-8,46	-16,80	1,02	-15,67	-2,91	-14,62	1,65	-1,75	1,00	1,28	1,20	1,20
CDKN2A	18,70	21,19	6,70	30,27	11,39	9,85	10,85	12,38	8,60	5,70	30,07	14,83	8,82	37,66	4,94	2,79	24,17	2,11	44,32	1,07	-1,02	58,28	-9,95	2,17	-1,43	1,00	-1,05	-1,06	1,06
CDNK2B	2,03	24,34	2,99	-1,13	4,20	-1,44	1,69	1,32	2,96	11,39	6,70	50,39	3,36	11,71	9,38	65,35	31,67	1,36	7,49	1,50	-3,69	-2,48	-2,27	-1,30	2,29	-1,00	1,04	1,24	1,24
ESR1	-314,08	-105,42	8,34	-2,40	-404,50	-2,97	1,36	-2,90	-222,86	5,98	-481,04	-205,79	-2,49	52,35	112,21	-131,60	-176,68	-146,53	-109,14	-1,45	-7,84	-180,39	-8,91	1,43	-52,17	1,00	-1,11	1,03	1,03
GSTP1	5,84	7,14	1,59	2,79	3,33	-5,54	-2,13	2,63	5,58	5,78	5,30	6,54	-2,15	3,88	-3,36	8,94	10,30	-2,30	5,48	1,95	-6,80	-4,49	-20,54	1,83	-2,09	1,00	-1,19	-1,01	1,01
MGMT	28,54	-23,67	-1,51	19,97	-1,22	-7,26	-74,03	-34,06	1,64	2,11	1,09	1,19	17,94	1,52	5,62	2,35	24,00	-12,13	-28,05	1,26	-2,04	-1,25	-44,63	-1,50	-17,21	1,00	-1,01	-1,00	1,00
MLH1	-1,32	-7,34	-2,25	-11,08	1,07	1,52	-1,32	-4,35	3,58	1,65	-4,36	-2,36	30,07	4,01	3,63	-10,93	-1,24	-64,45	-11,75	1,37	-6,99	-1,60	-388,02	-10,06	-1,14	-1,00	1,40	1,02	1,02
MSH6	1,53	-1,15	8,46	3,32	5,82	-1,23	4,98	-1,13	1,40	-4,13	-7,46	-3,12	4,77	2,27	-1,07	-3,39	2,51	-6,21	-6,82	1,24	-3,32	-2,57	-1,87	-2,92	2,86	-1,00	1,23	-1,01	1,01
PAX5	28,25	3,52	11,51	52,17	26,08	-1,21	2,25	1,55	18,06	30,07	28,74	8,94	5,58	5,10	5,19	25,37	29,14	3,57	4,18	-1,17	-1,56	5,39	-3,07	1,58	35,26	1,00	1,21	1,09	1,09
PAX6	16,51	-1,02	3,54	22,16	18,90	1,26	4,23	2,81	11,71	22,71	6,70	7,89	12,82	13,50	11,79	14,22	28,35	6,48	1,41	1,29	-1,83	-1,89	-15,40	2,44	-1,14	-1,00	1,08	-1,10	1,10
PTEN	-9,71	-3,38	-3,61	-1,35	-55,91	-4,64	-5,60	-3,99	-1,03	-1,47	-2,99	-3,92	2,25	-2,72	2,61	-5,58	-1,05	-47,51	-26,26	1,01	-12,91	-3,54	-7,81	1,02	-1,40	1,00	-1,01	-1,04	1,04
RARB	-3,24	-8,49	18,96	-6,00	-5,84	-15,73	-7,46	2,84	-4,08	-1,33	-10,97	-2,56	10,85	6,13	25,72	-4,50	14,27	-2,02	-5,24	1,08	-5,06	1,26	-40,50	-2,16	-1,80	1,00	1,10	1,03	1,03
RASSF1	-5,05	-18,77	-1,21	1,18	-2,25	-4,61	-4,14	-1,89	-29,04	2,87	-42,37	-5,48	-3,17	5,08	1,56	-1,08	7,54	-32,11	-1,30	-1,01	-4,41	-4,41	-54,76	-1,79	-3,24	1,00	1,11	1,05	1,05
STK11	2,67	-2,79	24,59	33,83	5,05	1,11	-2,48	2,05	-1,43	20,97	-1,97	-1,66	31,78	23,34	20,68	-1,44	2,65	-1,53	-4,84	1,09	-3,27	-1,53	-3,97	45,10	59,71	1,00	-1,06	-1,01	1,01
THBS1	13,50	-1,46	6,52	36,00	-5,70	-1,70	-2,09	-1,02	16,34	6,23	3,46	-4,86	2,51	2,71	30,17	17,63	42,22	-21,71	-7,09	1,06	-15,56	-5,26	-9,51	2,42	-5,19	1,00	1,14	1,17	1,17
TIMP3	-3,24	-11,67	4,03	2,59	-7,14	-8,28	-12,73	-9,10	-25,55	-14,83	-36,13	-44,32	-10,45	-8,03	9,88	-6,19	-2,04	-9,71	-31,34	1,59	-2,54	-1,68	-61,39	1,22	-1,31	-1,00	1,05	-1,15	1,15
TP53	29,86	-1,17	108,38	29,75	26,63	3,16	5,26	9,95	41,64	172,45	93,05	124,07	7,89	5,86	47,51	117,78	74,54	-4,35	152,75	1,09	-1,08	-4,18	-21,48	20,04	1,32	-1,00	1,01	-1,01	1,01
TP73	3,97	15,56	40,79	15,67	27,38	2,75	1,70	-1,37	13,74	6,70	29,14	62,47	2,17	2,10	25,90	39,12	40,93	-6,94	77,71	1,08	-3,05	-1,45	-22,24	10,52	-1,56	1,00	1,08	-1,01	1,01

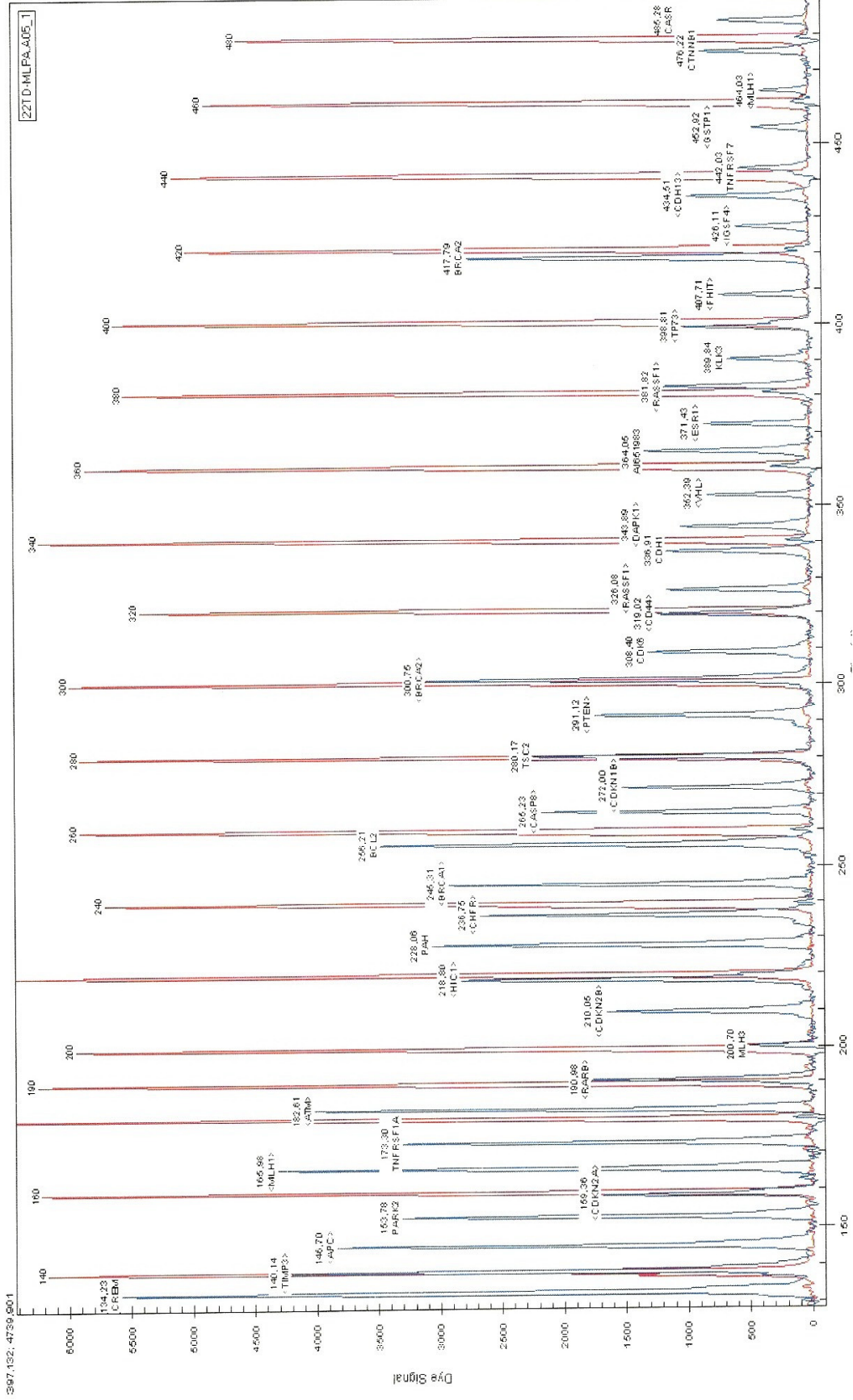
EK 6. DNA konsantrasyon ve saflık değerleri

Örnek	ng / µL	A ₂₆₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Örnek	ng / µL	A ₂₆₀	A ₂₆₀ / A ₂₈₀	A ₂₆₀ / A ₂₃₀
TD 22	171,82	3,436	1,90	3,71	TD 66	57,28	1,146	1,96	196
TD 23	76,01	1,52	1,98	3,33	TD 67	19,04	0,381	1,28	0,63
TD 24	61,74	1,235	1,91	3,03	TD 68	15,48	0,31	1,48	-1,22
TD 25	305,22	6,104	1,90	2,26	ND 22	82,29	1,646	1,95	2,17
TD 26	90,86	1,817	1,92	2,7	ND 23	8,78	0,176	1,76	-0,55
TD 27	12,63	0,253	2,15	1,77	ND 24	17,28	0,346	1,84	-5,48
TD 28	4,24	0,085	2,05	-0,69	ND 25	14,94	0,299	1,71	108,67
TD 29	71,88	1,438	2,07	1,86	ND 26	17,62	0,352	1,77	0,48
TD 30	18,98	0,38	2,15	1,56	ND 27	22,69	0,454	1,94	1,7
TD 31	132,31	2,646	2,05	2,16	ND 28	2,61	0,052	14,82	-0,77
TD 32	146,88	2,938	1,97	2,34	ND 29	11,57	0,231	1,60	0,42
TD 50	93,53	1,871	1,90	2,95	ND 30	36,08	0,722	2,58	0,48
TD 52	111,38	2,228	1,87	5,07	ND 31	110,05	2,201	2,00	3,75
TD 53	33,96	0,679	2,26	1,33	ND 32	8,01	0,16	1,62	-1,06
TD 54	103,71	2,074	1,83	5,38	ND 58	43,81	0,876	1,69	4,35
TD 55	55,62	1,112	1,83	20,55	ND 59	39,64	0,793	1,75	-3,94
TD 56	107,74	2,155	1,86	4,32	ND 60	11,83	0,237	1,28	-1,01
TD 57	30,68	0,614	1,79	-3	ND 61	101,47	2,029	1,65	1,62
TD 58	81,11	1,622	1,71	1,75	ND 62	149,14	2,983	1,74	2,29
TD 59	33,95	0,679	1,90	-5,56	ND 63	7,86	0,157	1,52	-0,44
TD 60	253,74	5,075	1,71	1,59	ND 64	132,36	2,647	1,44	0,85
TD 61	237,33	4,747	1,88	3,23	NN 1	43,12	-	1,76	-
TD 62	74,09	1,482	1,93	5,19	NN 2	200,20	-	1,79	-
TD 63	31,87	0,637	2,00	-2,89	NN 3	87,34	-	1,74	-
TD 64	119,04	2,381	1,90	3,38	NN 4	42,12	-	1,75	-
TD 65	143,84	2,877	1,41	0,79					

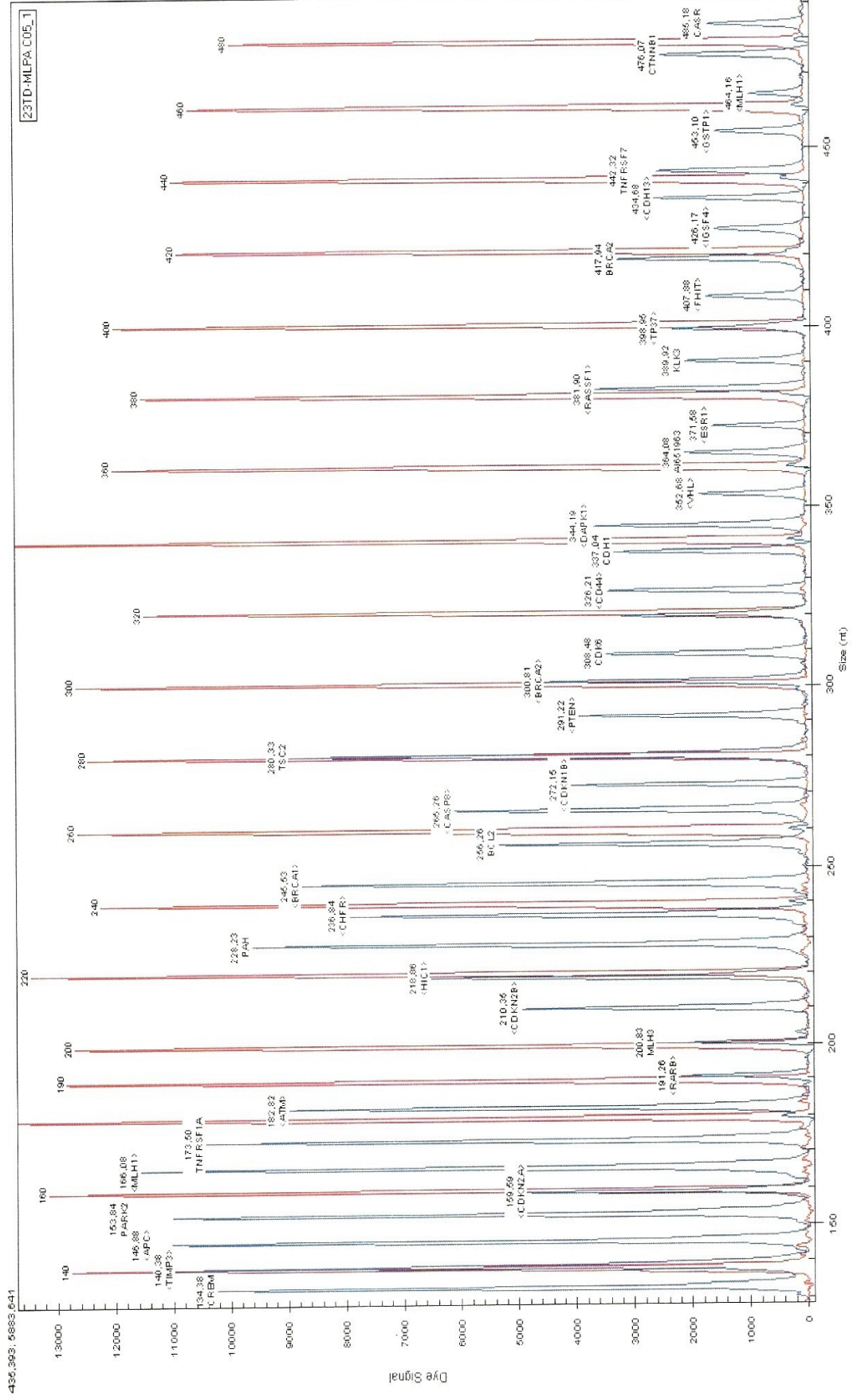
EK 7. 22T çalışmasına ait işlenmiş fragman analizi elektroferogram



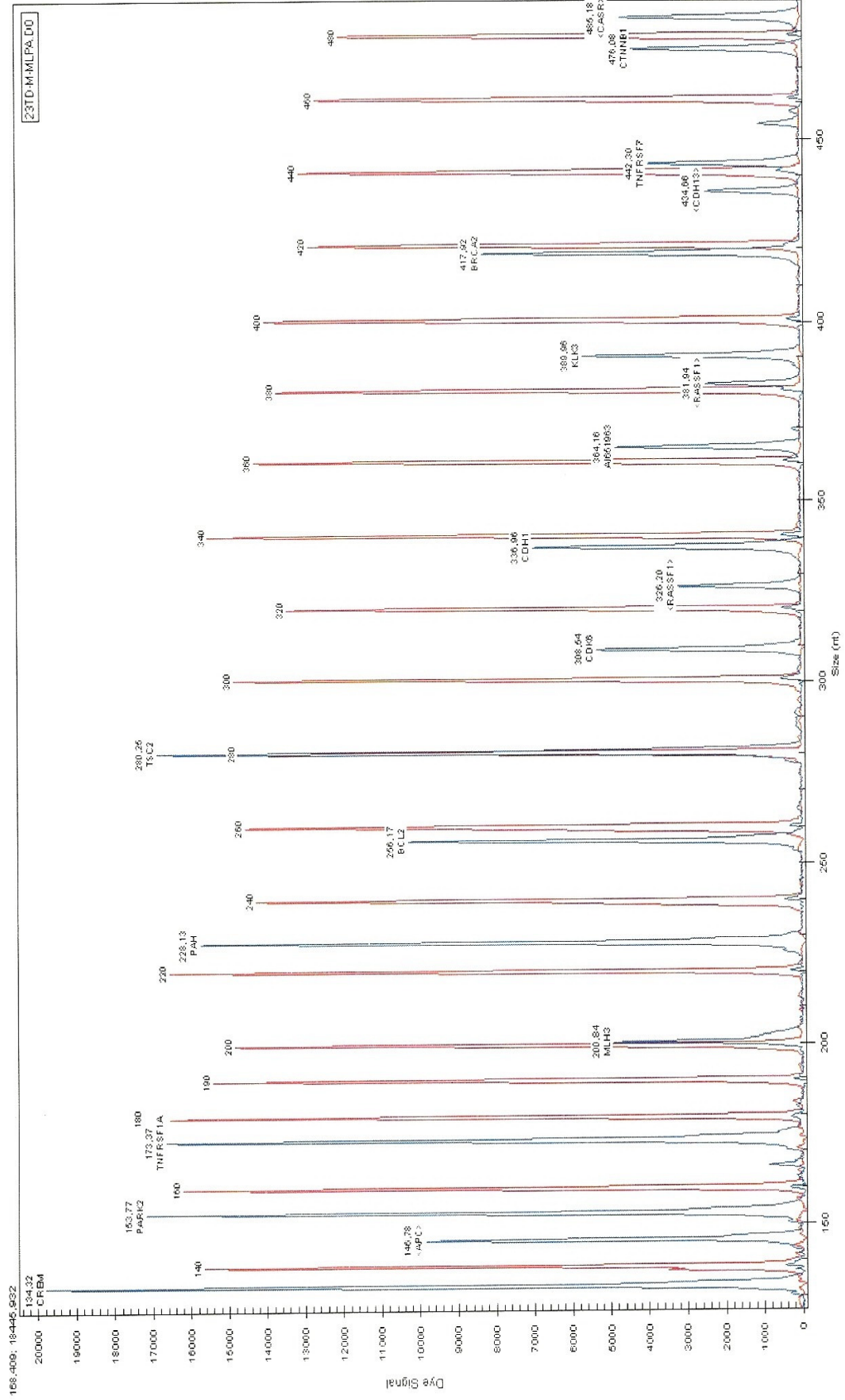
EK 8. 22T/m çalışmasına ait işlenmiş fragman analizi elektroferogram



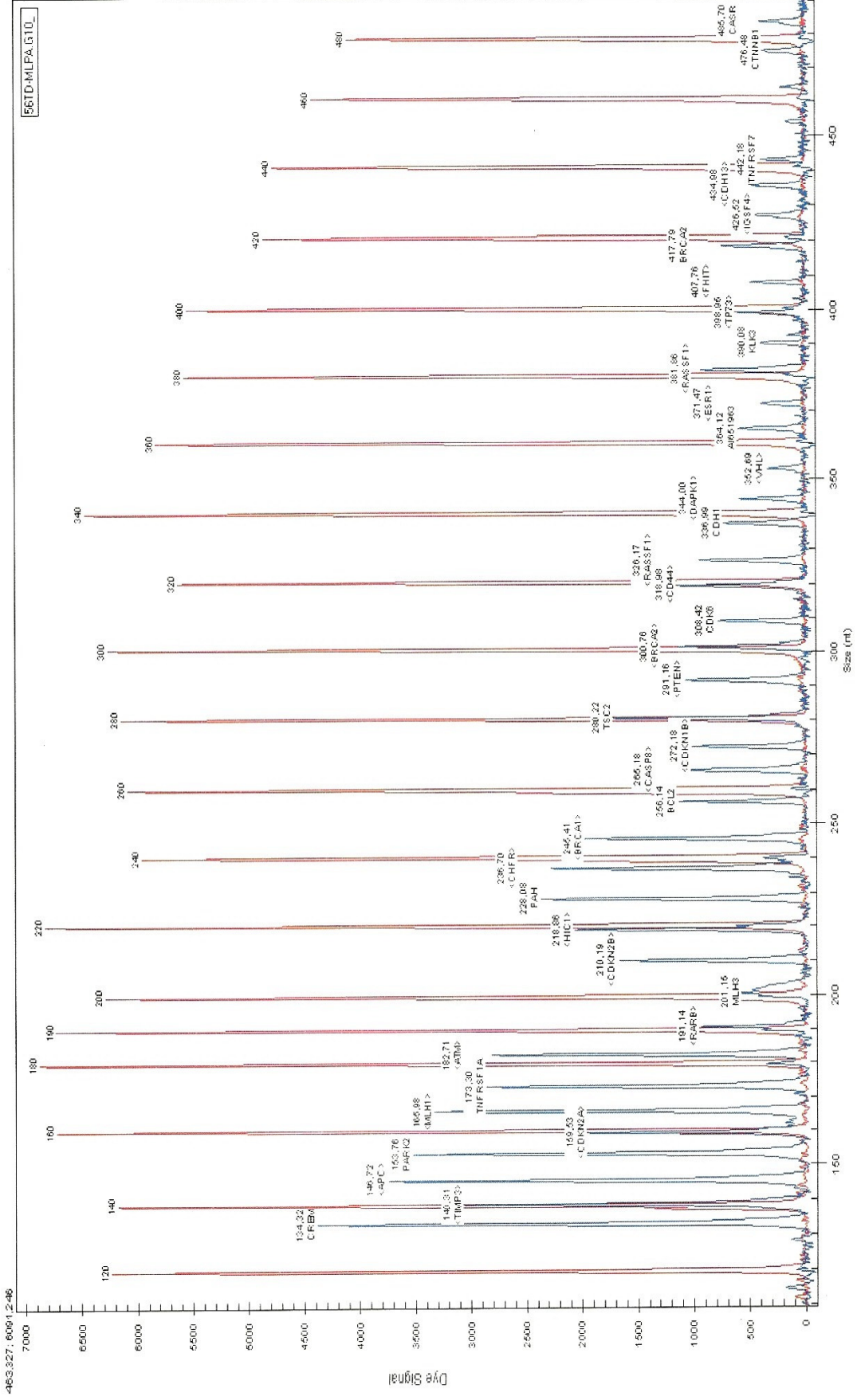
EK 9. 23T çalışmasına ait işlenmiş fragman analizi elektroferogram



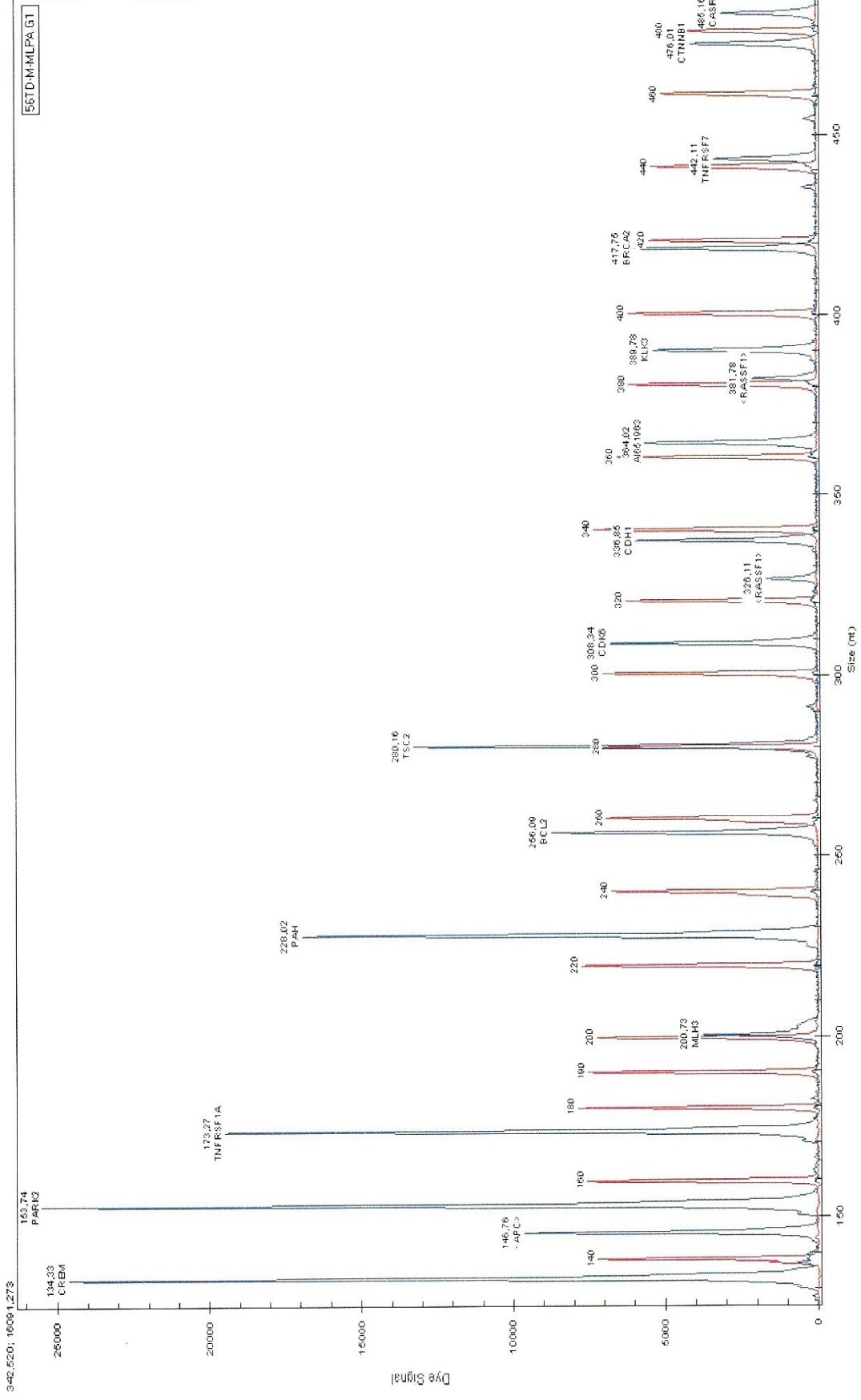
EK 10. 23T/m çalışmasına ait işlenmiş fragman analizi elektroferogram



EK 11. 56T çalışmasına ait işlenmiş fragman analizi elektroferogram



EK 12. 56T/m çalışmasına ait işlenmiş fragman analizi elektroferogram



EK 13. 22T çalışmasına ait fragman analizi pik değerleri listesi

RN	dye	size std	std frag size (nt)	est frag size (nt)	pk area (rfuxmm)	pk height (rfu)	mig time (min)	allele ID	comment
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	60	60,00	4548	5758	17,61			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	70	70,00	4795	5932	18,11			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	80	80,00	4439	6232	18,67			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	84,67	2729	3457	18,93	D-FRAG		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	90	90,00	4338	6056	19,19			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	90,58	3251	3572	19,25	D-FRAG		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	94,95	5606	6447	19,50	D-FRAG		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	100	100,00	4064	5881	19,76			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	120	120,00	4348	6093	20,88			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	134,23	4145	5565	21,68	CREM		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	140	140,00	4346	6074	21,99			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	140,14	3041	4167	22,02	<TIMP3>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	146,70	3066	3796	22,44	<APC>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	153,78	2474	3251	22,90	PARK2		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	159,36	1290	1675	23,27	<CDKN2A>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	160	160,00	4470	6249	23,29			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	165,98	3269	4239	23,68	<MLH1>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	173,30	2828	3327	24,14	TNFRSF1A		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	180	180,00	4839	6586	24,53			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	182,61	3080	3987	24,72	<ATM>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	190	190,00	4747	6237	25,17			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	190,98	1568	1782	25,26	<RARB>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	200	200,00	4427	5927	25,82			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	200,70	309	500	25,89	MLH3		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	210,05	1294	1612	26,51	<CDKN2B>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	218,80	2193	2736	27,10	<HIC1>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	220	220,00	4806	6640	27,16			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	228,06	2265	2991	27,71	PAH		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	236,75	2163	2615	28,30	<CHFR>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	240	240,00	4118	5605	28,49			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	245,31	2162	2848	28,88	<BRCA1>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	256,21	2891	3491	29,64	BCL2		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	260	260,00	4240	5804	29,88			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	265,23	1714	2183	30,28	<CASP8>		

EK 13 devam.

RN	dye	size std	std frag size (nt)	est frag size (nt)	pk area (rfuxmm)	pk height (rfu)	mig time (min)	allele ID	comment
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	272,00	1194	1468	30,75	<CDKN1B>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	280	280,00	4290	5888	31,30			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	280,17	1721	2225	31,34	TSC2		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	291,12	1375	1627	32,14	<PTEN>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	300	300,00	4272	5968	32,76			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	300,75	2436	3060	32,84	<BRCA2>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	308,40	1054	1254	33,40	CDK6		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	319,02	965	1219	34,19	<CD44>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	320	320,00	3874	5426	34,24			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	326,08	872	1156	34,71	<RASSF1>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	336,91	884	1153	35,51	CDH1		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	340	340,00	4364	6213	35,72			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	343,89	807	1037	36,03	<DAPK1>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	352,39	558	823	36,68	<VHL>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	360	360,00	4029	5855	37,23			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	364,05	1012	1333	37,56	A1651983		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	371,43	566	849	38,12	<ESR1>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	380	380,00	3693	5540	38,75			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	381,82	878	1132	38,91	<RASSF1>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	389,84	415	658	39,52	KLK3		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	398,81	701	1007	40,21	<TP73>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	400	400,00	3870	5610	40,28			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	407,71	496	727	40,91	<FHIT>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	417,79	1974	2760	41,72	BRCA2		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	420	420,00	3436	5029	41,87			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	426,11	445	586	42,38	<IGSF4>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	434,51	671	983	43,05	<CDH13>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	440	440,00	3572	5133	43,46			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	442,03	399	568	43,64	TNFRSF7		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	452,92	306	454	44,48	<GSTP1>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	460	460,00	3308	4876	45,00			
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	464,03	247	393	45,29	<MLHI>		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4 No	0	476,22	543	867	46,14	CTNNB1		
22TD-MLPA.A05 100420102X	D1 Yes	480	480,00	3009	4625	46,38			

EK 13 devam.

RN	dye	size std	std frag size (nt)	est frag size (nt)	pk area (rfuxmm)	pk height (rfu)	mig time (min)	allele ID	comment
22TD-MLPA.A05 100420102X	D4	No	0	485,28	517	735	46,81	CASR	
22TD-MLPA.A05 100420102X	DI	Yes	500	500,00	2848	4510	47,95		
22TD-MLPA.A05 100420102X	DI	Yes	520	520,00	3499	4039	49,46		
22TD-MLPA.A05 100420102X	DI	Yes	540	540,00	2600	4268	51,01		
22TD-MLPA.A05 100420102X	DI	Yes	560	560,00	2584	4201	52,55		
22TD-MLPA.A05 100420102X	DI	Yes	580	580,00	2750	3908	54,04		
22TD-MLPA.A05 100420102X	DI	Yes	600	600,00	2679	4174	55,50		
22TD-MLPA.A05 100420102X	DI	Yes	620	620,00	2521	3788	57,00		
22TD-MLPA.A05 100420102X	DI	Yes	640	640,00	2352	3924	58,46		

EK 14. 22T/m çalışmasına ait fragman analizi pik değerleri listesi

RN	dye	size std	std frag size (nt)	est frag size (nt)	pk area (rfuxmm)	pk height (rfu)	mig time (min)	allele ID	comment
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	60	60,00	6805	8154	17,43		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	70	70,00	7210	8578	17,93		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	80	80,00	6469	8316	18,48		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4	No	0	84,90	9553	11325	18,75	D-FRAG	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	90	90,00	6360	8286	18,99		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4	No	0	90,72	8272	9859	19,06	D-FRAG	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4	No	0	95,13	12620	14662	19,30	D-FRAG	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	100	100,00	5933	7882	19,56		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	120	120,00	6349	8558	20,65		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4	No	0	134,29	12086	14715	21,44	CREM	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	140	140,00	6418	8534	21,74		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4	No	0	153,79	8651	10261	22,63	PARK2	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	160	160,00	6718	8933	23,00		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4	No	0	173,45	8419	9583	23,84	TNFRSF1A	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	180	180,00	7029	9244	24,22		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	190	190,00	6910	8753	24,84		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	200	200,00	6624	8383	25,47		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4	No	0	200,79	2216	2629	25,54	MLH3	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	220	220,00	6855	8888	26,77		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4	No	0	228,20	6138	7400	27,32	PAH	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4	No	0	236,73	736	1011	27,88	<CHFR>	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	240	240,00	5979	8082	28,07		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4	No	0	256,26	7509	9189	29,19	BCL2	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	260	260,00	6295	8283	29,42		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	280	280,00	6294	8460	30,79		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4	No	0	280,28	5856	7226	30,83	TSC2	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	300	300,00	6374	8622	32,20		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4	No	0	308,53	4490	5470	32,82	CDK6	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	320	320,00	5805	7958	33,61		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4	No	0	326,23	620	865	34,08	<RASSF1>	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4	No	0	337,01	2450	3104	34,85	CDH1	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	340	340,00	6831	9612	35,04		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1	Yes	360	360,00	5921	8380	36,50		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4	No	0	364,14	3249	4093	36,82	AI651963	

EK 14 devam.

RN	dye	size std	std frag size (nt)	est frag size (nt)	pk area (rfuxmm)	pk height (r ² u)	mig time (min)	allele ID	comment
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1 Yes		380	380,00	5562	7990	37,96		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4 No		0	381,92	533	793	38,12	<RASSF1>	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4 No		0	389,95	1493	2032	38,70	KLK3	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1 Yes		400	400,00	5819	8420	39,42		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4 No		0	417,92	5647	7747	40,81	BRCA2	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1 Yes		420	420,00	5142	7616	40,94		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1 Yes		440	440,00	5405	7756	42,46		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4 No		0	442,27	1378	1807	42,65	TNFRSF7	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1 Yes		460	460,00	5241	7727	43,93		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4 No		0	476,15	1410	2073	45,02	CTNNA1	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1 Yes		480	480,00	4621	7221	45,26		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D4 No		0	485,27	2083	2868	45,67	CASR	
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1 Yes		500	500,00	4334	6893	46,75		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1 Yes		520	520,00	3782	5962	48,22		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1 Yes		540	540,00	4125	6595	49,67		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1 Yes		560	560,00	4265	6903	51,14		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1 Yes		580	580,00	4557	6540	52,55		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1 Yes		600	600,00	4518	7241	53,93		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1 Yes		620	620,00	4163	6396	55,35		
22TD-M-MLPA-.B05 100420102T	D1 Yes		640	640,00	4013	6584	56,73		

EK 15. mMLPA fragman büyüklükleri (ME001, kesilmemiş DNA)

	22TD	23TD	24TD	25TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	50TD	52TD	54TD	55TD	56TD	58TD	60TD	61TD	62TD	64TD	66BD	22ND	31ND	61ND	62ND	64ND
CREM	4.145	8.705	6.858	11.272	13.999	5.097	10.630	2.634	3.642	5.766	9.231	14.946	14.166	3.202	713	4.429	1.034	8.754	1.685	3.440	2.260	315	5.113	7.830	1.685
TIMP3	3.041	8.125	4.560	10.455	11.213	3.080	6.990	1.895	2.726	3.489	7.341	7.470	7.069	2.565	293	2.908	1.163	5.561	998	3.134	1.630	299	4.125	6.796	802
APC	3.066	9.087	6.840	13.002	11.420	4.917	7.994	4.477	2.691	5.049	7.738	8.773	13.191	2.774	557	3.628	810	8.519	1.067	3.104	1.161	266	3.132	5.996	1.067
PARK2	2.474	8.800	6.411	14.237	13.612	4.562	8.342	5.006	3.218	5.704	7.252	10.034	14.609	2.634	697	2.977	992	9.579	1.990	3.421	1.076	359	5.545	8.976	1.990
CDKN2A	1.290	3.834	2.662	7.340	6.021	2.226	4.572	1.037	1.212	3.595	5.228	6.845	6.701	1.529	283	285	885	4.944	1.003	2.174	211	107	2.098	3.575	810
MLHI	3.269	9.494	7.396	12.439	13.088	4.981	9.216	1.479	3.930	4.238	8.664	7.866	12.010	2.342	520	4.631	802	9.178	1.214	3.669	948	490	3.401	6.355	1.214
TNFRSF1A	2.828	8.915	5.092	9.562	10.645	3.167	7.176	3.161	3.458	4.433	7.730	11.188	10.868	2.094	341	5.000	812	6.490	1.446	2.641	819	289	4.371	6.224	1.446
ATM	3.080	7.674	3.949	10.780	8.517	4.554	7.165	2.350	3.714	5.143	8.402	6.165	8.177	2.080	139	2.243	984	5.803	1.008	2.743	1.028	366	3.104	6.208	1.008
RARB	1.568	1.688	1.902	4.195	3.548	1.176	3.327	268	550	1.406	2.666	2.152	3.125	666	62	1.262	296	2.737	540	782	75	310	1.219	2.147	155
MLH3	309	1.585	2.643	2.945	1.607	1.230	2.428	500	450	661	1.699	1.786	2.288	402	61	499	107	1.931	504	331	40	332	427	804	88
CDKN2B	1.294	4.042	2.739	8.262	5.291	2.602	4.331	1.001	1.667	2.799	4.472	6.692	7.870	1.211	220	339	667	5.297	585	1.871	202	335	1.872	3.834	475
HIC1	2.193	5.267	4.085	8.768	7.047	2.726	4.869	1.633	2.776	3.020	6.374	6.922	9.047	1.618	364	2.633	606	4.926	777	2.103	606	338	2.522	4.637	487
PAH	2.265	8.055	4.600	10.117	7.779	3.985	7.716	3.343	2.485	3.506	6.901	7.342	10.206	1.745	492	3.645	748	5.254	997	2.120	647	288	3.642	6.175	953
CHFR	2.163	6.598	4.222	8.634	6.482	4.133	5.903	1.500	2.262	3.557	5.168	5.989	7.312	1.705	299	2.980	524	3.481	599	1.760	768	144	1.902	4.044	620
BRCA1	2.162	7.496	3.363	10.479	8.485	4.149	5.659	2.075	2.242	3.146	6.479	5.507	7.785	1.428	419	2.795	454	4.538	565	1.831	532	280	2.233	4.032	481
BCL2	2.891	4.416	2.686	6.763	7.040	2.479	5.696	1.241	1.247	1.212	2.529	3.024	6.847	731	237	1.717	270	2.625	407	985	913	157	1.829	3.021	433
CASP8	1.714	4.670	2.675	5.649	4.699	3.293	3.854	1.642	2.420	2.959	5.187	4.662	6.129	878	232	1.895	323	3.475	340	1.050	515	140	1.799	2.720	318
CDKN1B	1.194	3.160	2.174	3.987	3.091	1.735	2.759	1.413	1.779	1.778	2.397	2.130	3.906	485	207	2.372	2.410	2.733	291	746	224	144	1.456	2.509	241
TSC2	1.721	7.350	3.940	8.769	7.548	3.239	6.086	3.667	1.625	3.953	5.470	4.593	9.727	1.200	370	2.658	448	3.190	902	1.210	457	380	2.308	4.369	512
PTEN	1.375	3.222	2.149	6.200	4.097	1.854	3.545	686	954	2.144	3.011	2.836	5.984	848	99	1.973	366	3.015	410	849	434	171	1.571	2.978	372
BRCA2	2.436	3.781	1.793	5.850	4.190	1.007	2.466	896	1.787	2.206	2.931	1.927	4.746	841	272	1.806	317	2.553	442	800	427	119	1.227	2.792	301
CDK6	1.054	2.817	1.532	3.115	3.024	1.444	3.303	1.221	821	1.381	2.102	2.090	4.877	532	52	586	410	1.647	127	412	296	194	1.048	1.804	127
CD44	965	2.639	1.879	3.548	3.122	2.398	3.520	634	1.161	1.657	2.975	3.333	4.615	838	80	1.358	390	2.069	267	620	217	110	1.092	1.992	1.034
RASSF1	872	2.423	1.971	5.274	3.242	1.377	2.348	365	1.072	1.675	2.579	2.304	5.051	671	77	1.626	270	1.893	217	779	227	47	1.091	2.224	501

EK 15 devam

	22TD	23TD	24TD	25TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	50TD	52TD	54TD	55TD	56TD	58TD	60TD	61TD	62TD	64TD	66BD	22ND	31ND	61ND	62ND	64ND
CDHI	884	2.591	1.811	4.680	3.860	1.609	2.031	778	1.140	1.155	2.713	2.003	4.083	576	132	2.009	281	2.105	418	607	233	53	1.109	2.171	589
DAPK1	807	2.970	1.393	7.259	3.916	1.200	2.436	453	947	1.591	2.258	2.281	5.571	338	77	1.186	280	1.633	85	606	184	38	1.156	1.971	452
VHL	558	1.446	1.252	2.971	1.926	585	1.226	164	513	623	1.942	1.686	2.721	222	20	829	95	1.200	78	320	116	21	486	1.194	629
AI651983	1.012	1.707	1.402	2.575	2.970	1.290	1.766	1.449	1.028	882	1.662	1.834	3.257	459	55	809	190	1.053	42	374	157	57	841	1.510	666
ESR1	566	1.170	1.343	2.933	2.391	773	1.442	317	562	891	1.058	934	2.641	325	21	512	108	952	79	311	120	40	553	1.153	413
RASSF1	878	2.726	1.620	4.472	1.990	1.514	2.068	745	1.124	1.722	2.716	2.469	4.807	638	54	1.335	377	1.188	151	442	190	63	906	1.839	782
KLK3	415	1.618	1.020	3.014	2.182	771	1.776	474	568	719	1.295	1.017	3.077	121	22	674	127	1.185	69	373	65	14	773	1.071	502
TP73	701	1.636	1.075	4.055	2.637	987	1.462	282	865	1.030	2.185	970	3.284	302	65	653	200	1.086	120	380	182	18	689	1.208	404
FHIT	496	1.322	669	2.763	1.818	977	1.249	392	701	779	1.524	922	2.956	288	18	822	212	1.052	130	386	96	16	681	1.340	209
BRCA2	1.974	2.492	2.012	4.185	4.725	915	2.123	1.471	1.053	1.515	2.542	1.475	4.413	480	67	1.491	229	1.105	105	594	300	21	1.141	1.658	216
IGSF4	445	1.314	563	1.922	1.707	695	1.267	445	334	725	2.083	701	2.171	141	21	709	101	908	98	311	92	14	513	1.321	238
CDHI3	671	1.923	1.245	2.654	1.905	958	1.434	377	314	786	2.113	1.798	3.342	209	28	501	300	807	70	323	89	18	601	1.327	294
TNFRSF7	399	1.989	1.033	2.203	1.642	881	1.242	665	966	955	1.573	987	1.737	206	19	909	157	734	64	288	76	20	717	1.200	297
GSTP1	306	1.253	1.275	2.047	829	555	989	150	249	488	782	815	2.483	93	14	438	46	378	59	226	105	19	289	851	90
MLH1	247	688	675	1.773	911	449	825	113	404	412	962	313	1.458	46	16	347	70	380	37	190	82	17	396	663	74
CTNNB1	543	1.921	927	3.184	1.560	778	1.385	411	609	867	2.023	1.017	2.927	125	20	1.145	25	733	20	266	130	20	752	1.208	284
CASR	517	1.245	731	2.577	1.002	752	986	410	830	893	1.381	1.006	2.732	77	32	776	110	841	34	251	108	17	510	987	293

EK 16. mMLPA fragman büyüklükleri (ME001, Hhal ile kesilmiş DNA)

	22TD	23TD	24TD	25TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	50TD	52TD	54TD	55TD	56TD	58TD	60TD	61TD	62TD	64TD	66BD	22ND	31ND	61ND	62ND	64ND
CREM	12.086	13.943	16.747	26.687	35.205	8.054	28.058	3.722	9.432	27.554	32.710	16.696	7.363	17.599	4.096	6.865	10.554	2.238	24.314	26.091	15.673	3.906	19.904	14.404	8.050
PARK2	8.651	12.366	15.050	22.646	31.508	8.177	23.689	5.878	8.635	24.118	27.776	13.070	8.210	17.988	4.196	5.291	12.400	2.363	24.970	27.487	9.192	3.966	22.912	15.304	6.264
TNFRSF1A	8.419	12.322	13.304	23.594	25.964	6.334	18.212	4.072	8.136	20.768	25.511	13.953	6.372	13.036	2.707	8.047	10.236	1.497	18.535	19.951	7.445	4.754	16.033	9.813	5.753
MLH3	2.216	3.850	4.173	7.204	8.924	1.125	6.707	406	1.802	3.543	7.570	1.613	1.293	2.625	578	781	1.380	816	3.042	4.225	1.813	705	1.593	2.285	627
PAH	6.138	11.630	11.877	22.619	23.561	6.549	21.888	4.003	6.351	17.997	25.249	9.060	6.017	11.516	2.653	5.498	7.330	1.658	17.709	18.771	6.485	3.200	13.254	7.304	4.853
BCL2	7.509	7.625	7.338	15.454	19.130	4.100	15.733	1.072	2.165	8.883	9.937	4.856	3.394	5.558	1.502	3.492	4.611	1.330	10.031	9.741	8.402	1.634	6.427	4.579	2.716
TSC2	5.856	12.094	11.783	19.390	21.620	5.699	15.904	2.832	4.486	18.379	19.766	5.120	6.015	8.451	2.127	4.759	5.588	1.600	12.750	12.541	5.283	2.877	8.915	5.018	2.069
CDK6	4.490	4.280	4.502	10.630	12.844	1.943	8.210	1.034	1.906	6.017	7.574	2.426	2.506	4.338	823	1.114	3.063	479	5.399	5.098	3.187	743	2.707	2.627	1.133
CDH1	2.450	5.327	5.118	10.248	10.555	2.526	4.988	1.238	2.542	6.310	10.337	2.478	2.283	4.068	1.222	3.149	3.266	700	6.063	7.555	2.986	1.264	4.045	2.719	1.647
AI651983	3.249	3.769	4.570	7.092	8.901	2.272	6.391	1.097	2.403	5.401	6.181	2.679	2.065	3.784	879	1.360	3.020	385	6.161	5.534	2.334	927	3.803	1.531	425
KLK3	1.493	4.172	2.735	5.906	7.047	1.567	4.902	193	760	4.252	4.949	1.741	2.203	3.515	524	1.271	2.215	250	4.351	4.190	1.150	669	2.182	1.349	496
BRCA2	5.647	6.067	5.247	11.284	13.170	1.354	5.136	1.463	2.265	8.411	8.957	2.873	2.425	3.890	1.459	2.074	3.483	420	7.133	7.610	5.136	643	3.317	2.030	1.020
TNFRSF7	1.378	2.813	2.530	5.941	5.143	1.498	3.684	533	1.259	3.736	5.630	2.144	1.245	2.269	292	1.308	2.329	203	3.818	3.530	1.166	792	1.727	785	279
CTNNB1	1.410	3.087	3.088	5.506	5.405	1.503	3.318	263	812	4.287	6.106	1.664	1.562	2.689	624	1.871	2.594	280	5.035	4.472	1.590	471	2.163	1.120	433
CASR	2.083	3.418	2.775	6.083	5.682	1.362	3.804	420	947	4.333	5.548	1.442	1.596	1.913	290	1.131	2.139	220	5.135	3.861	867	601	2.654	1.201	677
TIMP3	.	1.864	892	743	.	1.055	.	475
APC	.	6.919	4.535	.	.	5.242	2.473	1.312	9.830	11.078	.	.	6.485	782	885	.	843	435	2.134
CDKN2A	1.012	.	201	750	.	524
MLH1	333	423	.	755	.	661
ATM	2.521	235
RARB	2.898
CDKN2B
HIC1	432
CHFR	736
																									1.444

EK 16 devam

22TD	23TD	24TD	25TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	50TD	52TD	54TD	55TD	56TD	58TD	60TD	61TD	62TD	64TD	66BD	22ND	31ND	61ND	62ND	64ND		
BRCA1	.	.	.	6.645	.	.	.	849	
CASP8	235	
CDKN1B
PTEN	391
BRCA2	11,462
CD44
RASSF1	620	2.378	973	1.730	1.397	709	860	309	1.918	1.444	673	974	1.940	709	1.146	366
DAPK1	.	.	1.688
VHL
ESR1	920
RASSF1	533	1.738	1.069	1.426	1.721	647	212	2.206	1.417	686	1.352	1.776	640	686	408
TP73	.	.	331
FH1T
IGSF4	591
CDH13	.	1.727	1.300	1.009	393
GSTP1	.	.	877	.	.	496	1.515	797
MLH1

EK 17. mMLPA fragman büyüklükleri (ME002, kesilmemiş DNA)

	22TD	23TD	24TD	25TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	50TD	52TD	54TD	55TD	56TD	58TD	60TD	61TD	62TD	64TD	66BD	22ND	31ND	61ND	62ND	64ND
CREM	11.080	12.825	8.532	41.614	61.243	38.466	15.183	8.323	501	9.607	1.980	29.551	34.285	31.493	25.119	22.278	16.169	4.775	10.991	17.803	46.441	24.954	18.648	10.378	9.532
BRCA1	1.429	3.741	3.491	10.532	19.640	3.293	1.871	653	290	4.560	1.560	12.172	19.928	13.543	11.972	11.824	8.077	1.065	6.640	4.228	16.343	16.694	9.547	4.402	2.690
BRCA2	5.980	6.791	7.353	13.809	30.569	5.349	5.284	995	1.968	9.982	2.805	17.182	33.435	20.929	31.272	23.056	13.664	2.338	11.140	15.798	60.561	26.902	19.107	9.316	10.284
PARK2	10.500	12.762	8.104	35.814	55.746	37.400	19.766	9.712	935	7.909	1.481	20.004	33.428	17.297	25.410	13.361	15.056	4.807	12.706	11.356	28.642	24.533	20.235	10.149	13.819
ATM	2.329	2.866	4.532	9.385	16.577	1.178	1.811	857	592	6.997	1.680	12.995	20.184	11.675	13.675	10.629	10.149	543	8.196	7.817	28.466	22.158	13.487	5.821	4.372
TP53	1.350	2.019	3.259	7.416	10.012	2.381	2.580	867	265	4.165	880	9.013	17.925	7.819	10.574	12.216	7.216	892	5.213	3.673	14.797	18.102	8.763	4.723	3.537
PTCH	8.882	13.221	8.139	42.951	56.464	38.983	15.115	6.087	467	8.994	1.980	25.194	34.833	20.713	17.412	18.711	15.209	3.268	10.548	7.786	23.769	30.925	18.263	8.806	8.801
P TEN	1.732	3.666	5.228	7.244	12.322	1.371	1.895	542	294	9.979	1.360	11.068	21.399	14.468	11.417	18.626	8.488	903	9.822	5.253	19.004	21.241	11.373	5.368	3.703
MGMT	4.934	7.767	4.582	19.068	20.113	5.808	3.692	140	749	6.004	1.180	13.657	19.787	8.738	13.200	13.126	8.937	363	6.667	6.337	26.792	18.736	10.716	4.320	3.258
MLH3	1.008	1.347	955	5.145	9.864	4.401	1.042	1.132	90	3.512	330	6.275	7.558	6.575	1.465	7.795	5.435	612	3.052	1.231	7.089	5.890	4.463	2.710	2.869
PAX5	1.693	3.630	2.826	8.759	11.080	6.225	1.115	635	883	4.393	1.180	12.830	18.767	7.473	8.317	9.708	8.093	436	6.020	3.030	13.201	13.504	10.408	4.303	3.785
CDH13	4.142	9.534	5.533	21.346	34.114	7.530	3.086	994	1.541	4.549	1.600	12.442	22.907	8.169	8.491	11.282	10.396	634	7.492	7.056	23.588	17.513	13.191	6.042	1.790
PAH	6.131	8.138	4.540	23.569	29.712	26.732	9.128	5.398	820	5.892	1.380	11.300	17.224	10.438	12.084	14.306	8.018	2.773	7.182	7.303	14.263	16.499	10.284	5.355	6.200
TP73	3.134	6.068	4.320	14.212	21.896	3.668	5.010	515	1.073	7.186	1.380	11.658	22.441	8.878	8.532	13.717	8.847	1.090	7.115	4.961	18.776	19.196	14.509	6.653	3.599
WT1	3.801	8.950	5.521	18.287	36.759	8.613	6.052	386	250	6.606	1.260	13.648	24.813	4.556	12.203	13.258	9.470	770	4.812	5.503	20.406	17.782	13.212	5.832	8.212
PMP22	4.360	6.269	2.714	19.228	28.102	18.935	4.988	2.817	230	3.082	600	7.874	14.022	3.989	9.640	8.700	5.343	1.260	2.982	2.237	12.878	11.161	9.220	3.792	2.905
VHL	1.845	3.351	2.372	6.908	6.231	1.170	1.640	210	193	3.960	1.080	8.695	10.476	4.882	5.455	8.793	4.272	411	3.086	1.702	14.387	11.488	5.402	2.263	3.065
GSTP1	1.004	3.498	3.900	3.660	6.544	2.419	985	121	99	2.515	540	4.189	9.388	1.088	2.813	6.361	2.992	209	2.492	1.857	9.722	8.347	4.136	1.821	1.764
TSC2	5.669	12.251	3.204	21.863	39.318	26.784	6.132	3.661	541	6.709	800	9.023	21.843	4.611	4.452	12.271	5.879	1.699	5.537	2.631	14.200	15.720	9.756	4.337	1.912
CHFR	2.254	4.837	4.006	10.649	18.141	4.263	1.478	339	570	5.036	1.030	7.905	15.283	2.100	8.373	11.832	5.711	552	4.940	2.596	15.777	18.883	8.373	5.016	1.030
ESR1	2.353	4.062	2.774	9.736	17.520	2.387	837	371	640	4.129	810	6.859	13.871	1.314	7.942	6.062	4.804	614	4.895	5.020	17.988	11.993	9.706	4.205	5.346
TNXB	1.339	3.849	1.184	7.478	12.112	9.147	1.065	1.235	63	2.182	580	4.611	4.277	3.800	8.100	4.894	2.156	326	1.793	704	6.474	5.766	1.851	1.318	3.191
RB1	3.466	5.887	2.144	11.734	12.789	2.503	662	81	822	7.355	860	6.429	13.873	3.012	1.130	10.077	7.958	1.951	3.866	2.604	19.576	10.112	8.931	2.826	2.403
MSH6	1.480	3.703	1.161	6.667	7.652	8.722	899	61	89	1.652	270	1.969	5.696	1.200	2.300	6.820	2.113	199	1.282	1.192	4.351	7.563	3.845	903	1.010
APC	2.800	7.966	1.831	16.781	24.781	11.008	2.327	2.506	332	2.869	580	4.918	11.906	4.200	1.117	6.264	3.741	686	2.724	893	8.478	7.066	5.683	2.015	650
THBS1	1.116	1.360	1.456	5.211	3.260	671	931	103	65	2.355	580	1.009	8.683	782	2.638	5.964	3.931	228	2.520	1.429	7.186	7.512	5.299	1.711	1.809

EK 17 devam

	22TD	23TD	24TD	25TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	50TD	52TD	54TD	55TD	56TD	58TD	60TD	61TD	62TD	64TD	66BD	22ND	31ND	61ND	62ND	64ND
IGSF4	1.101	260	902	3.064	18.421	2.240	218	210	199	2.836	340	1.284	6.344	1.620	3.200	2.862	3.918	697	2.441	922	6.786	6.749	5.147	1.723	782
PTEN	2.410	5.693	1.369	10.058	17.853	9.869	1.005	1.416	55	1.787	480	2.473	7.281	1.211	4.388	5.895	2.651	715	2.005	1.100	6.217	3.868	5.247	1.456	1.250
STK11	2.398	7.346	1.786	10.257	16.638	2.454	1.576	340	145	3.621	530	3.331	13.752	1.220	2.026	5.310	3.823	627	2.964	3.469	12.122	12.069	7.389	2.261	1.100
MGMT	1.483	2.245	530	4.105	6.546	3.493	142	278	110	1.297	170	1.674	3.315	1.120	1.105	1.668	1.794	302	933	182	7.226	3.628	2.049	844	820
PARK2	1.552	4.865	835	10.329	17.650	6.966	1.069	651	120	1.406	160	2.344	5.685	1.320	1.099	2.505	2.288	256	1.327	349	4.376	4.373	3.413	1.216	540
PYCARD	720	1.426	740	4.260	5.226	2.362	253	40	165	1.046	250	370	4.500	298	951	2.920	1.242	79	731	536	3.265	4.339	2.208	668	520
PAX6	1.081	2.131	1.027	3.280	4.097	1.595	338	65	188	1.255	250	895	6.276	480	1.239	2.550	2.051	206	1.680	716	6.148	4.463	3.832	1.225	301
ATM	2.312	4.533	555	8.295	9.211	5.228	11.247	1.370	86	1.205	240	862	3.532	365	986	2.214	1.950	413	1.014	543	7.056	2.689	2.749	921	480
CDKN2A	460	957	405	1.974	8.133	287	225	22	55	838	230	1.538	4.765	612	572	403	1.852	99	752	246	2.201	3.020	2.577	668	140
GATA5	1.026	1.191	220	3.012	4.412	1.049	211	29	56	636	160	355	1.716	511	320	728	1.067	82	528	265	2.887	1.661	1.429	282	80
IL2	863	4.491	615	6.677	7.200	5.462	488	602	45	736	150	622	3.851	419	599	3.094	1.570	39	766	209	4.995	2.646	2.722	699	80
RARB	2.260	3.492	685	7.245	6.906	2.284	253	82	45	1.149	280	914	4.145	174	895	2.880	1.720	95	1.004	121	6.669	3.300	2.739	708	240
CD44	1.498	2.609	428	4.973	3.904	2.159	545	199	48	995	285	867	4.308	388	1.064	2.350	1.513	168	1.106	305	5.015	3.611	2.879	715	235
RB1	989	2.175	305	4.257	4.302	753	165	603	89	862	80	520	1.633	396	337	2.222	1.033	43	513	98	4.528	2.417	2.030	420	234
CASR	717	3.056	535	7.029	7.857	7.118	620	478	51	956	290	602	2.872	364	307	1.988	1.611	271	1.113	411	3.421	2.773	2.490	1.213	220

EK 18. mMLPA fragman büyüklükleri (ME002, HhAI ile kesilmiş DNA)

	22TD	23TD	24TD	25TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	50TD	52TD	54TD	55TD	56TD	58TD	60TD	61TD	62TD	64TD	66BD	22ND	31ND	61ND	62ND	64ND
CREM	16.916	9.046	1.950	22.544	37.022	31.800	11.080	3.839	3.300	11.258	8.896	33.172	57.507	29.061	1.440	19.711	17.307	4.178	18.048	17.441	80.376	33.062	25.394	9.797	9.827
PARK2	17.123	10.066	2.200	22.453	38.171	29.943	12.994	5.794	3.915	9.220	5.811	22.755	61.562	22.955	1.490	13.175	14.403	4.118	21.720	17.738	57.600	37.530	24.733	9.996	9.044
PTCH	14.320	7.921	1.950	19.938	36.812	30.662	9.193	3.162	2.728	10.305	7.203	29.222	61.048	18.697	1.560	15.544	16.210	3.011	19.508	16.735	49.462	40.493	23.379	8.851	8.339
MLH3	1.281	1.286	440	2.083	6.716	5.764	877	341	1.933	3.079	3.589	8.326	21.603	6.415	330	4.797	5.472	1.374	6.692	4.695	26.914	15.530	10.768	4.413	3.938
PAH	5.988	5.719	1.100	13.344	20.736	25.158	5.680	2.990	1.306	6.022	5.176	15.487	31.137	11.606	880	11.919	8.100	1.995	13.859	9.623	32.899	21.281	14.468	5.638	5.247
PMP22	5.166	3.006	760	9.593	16.942	16.281	3.156	1.501	1.323	3.816	3.057	11.124	25.927	5.546	600	7.395	6.142	1.812	8.635	5.356	25.945	16.850	11.967	3.953	4.309
TSC2	4.938	6.161	870	11.922	21.809	22.653	3.832	3.818	530	7.315	4.112	10.762	32.892	6.878	850	8.468	6.151	2.052	10.103	6.621	29.287	20.279	12.171	4.451	4.432
TNXB	903	1.169	430	2.469	6.792	9.973	1.059	698	578	2.511	8.430	5.542	9.464	1.976	285	2.030	2.530	802	3.887	1.797	12.063	8.852	3.471	1.440	1.269
APC	2.991	2.447	540	8.544	15.367	12.941	1.240	2.582	454	3.281	3.122	6.326	19.913	3.764	380	5.933	4.081	1.428	5.389	3.185	19.106	9.907	9.280	2.978	3.396
PTEN	1.689	2.077	320	4.059	11.257	6.203	985	1.022	386	2.175	2.306	4.963	11.534	2.500	270	3.922	2.621	862	4.114	2.409	13.211	6.080	5.746	2.354	2.098
PARK2	1.102	1.456	240	3.402	8.191	10.572	488	855	108	1.558	1.078	3.707	9.157	1.539	16	1.590	2.180	975	2.622	1.473	8.814	5.462	4.819	1.598	1.761
ATM	1.621	1.558	170	3.744	8.924	6.999	677	737	260	1.276	1.114	3.063	6.390	1.265	50	2.144	1.813	812	2.384	1.155	12.055	4.262	3.981	1.497	1.454
IL2	1.195	1.402	150	2.041	7.706	7.369	440	665	206	580	413	2.091	6.104	824	124	1.714	1.554	726	1.682	782	6.302	3.627	3.156	1.111	1.155
CASR	1.451	1.264	200	3.364	6.943	8.103	510	553	226	1.101	1.501	2.884	7.348	1.113	198	2.194	1.916	707	2.253	529	6.872	3.284	3.952	1.044	1.447
BRCA1	107	338							274	531	1.879	703				625	686					1.060			
BRCA2	116	340	474	667	638	1.291			227		264	943			130	872	278		554	410	2.775	1.924	953	229	188
ATM			279									853				844									
TP53	230		194	691		711			349			288	410			419	102	178	261		932	523			
PTEN	122		386			546						615	320			349	310				528	464			
MGMT	156					640							877			504	316		403	165	1.439	1.023			
PAX5	528	486	240	626		1.487							3.833	252	160	1.308			394				737		339
CDH13	265	359	650	838	775			956	118			958	3.422	3.038	169	2.568	1.185		2.739	578	9.447	6.610	1.441		166
TP73			170	236								353	1.493	2.918			423		766	280	2.253	1.759	495		
WT1			270	672		446				264		629	7.668	3.756	110	5.536	1.602		1.385	611	2.183	3.276	1.113	266	123
VHL				161					91	690		856		375			465	469							
GSTP1		61				434										2.107	207		721						

EK 18 devam

	22TD	23TD	24TD	25TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	50TD	52TD	54TD	55TD	56TD	58TD	60TD	61TD	62TD	64TD	66BD	22ND	31ND	61ND	62ND	64ND
CHFR	192			218																	7.016				
ESR1		194		312	704						1.716	513	1.946	332	30		450	101	1.053	371	1.747	1.557	771	186	144
RB1	48								2.875	9.803	12.278	8.000	8.154	9.455	7.424	203					139				
MSH6	149			412		603					139	690					133	380	574	108	848	1.122	69		
THBS1				217															499			497			
IGSF4									410	1.666	2.602	4.103	1.556			2.858	1.487	1.278	104						
STK11											143	140													
MGMT			100		677						293	365	60						302	131	841	529	445		
PYCARD											43	180													
PAX6						477					172	899	223	42	580			114							
CDKN2A													236												
GATA5						516						135			489			102			131				
RARB						221					128		140					41				247			
CD44		50				393					99	138							117						
RB1	206	95																	22						

EK 19. Normalizasyon sonrası metilasyon beta skorları (%)

	22TD	23TD	24TD	25TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	50TD	52TD	54TD	55TD	56TD	58TD	60TD	61TD	62TD	64TD	66BD	22ND	31ND	61ND	62ND	64ND	MM1	MM2	MM3			
APC	0	52	42	18	0	0	19	24	43	18	43	39	0	30	38	0	70	0	0	0	3	10	0	7	4	52	3	0	7		
ATM-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	2	0	7	0	4	0	0	0		
ATM-2	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	6	3		
BRCA1-1	0	0	0	0	27	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
BRCA1-2	0	4	0	6	0	0	0	0	18	10	29	5	0	0	0	6	8	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0		
BRCA2-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
BRCA2-2	0	2	19	6	3	15	35	0	2	0	0	1	2	0	7	4	2	0	3	2	2	2	5	4	3	2	0	13	0		
CASP8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0		
CD44-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CD44-2	0	5	0	0	0	15	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CDH13-1	0	48	41	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	55	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CDH13-2	6	5	35	8	3	0	0	100	1	0	0	6	7	36	16	32	11	0	18	4	14	20	6	0	9	9	25	10	0		
CDKN1B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	
CDKN2A-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	14	9	0	18	0	10	9	0	0	
CDKN2A-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CDKN2B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	8	0	0	0	
CHFR-1	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	
CHFR-2	11	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0	
DAPK1	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ESR1-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESR1-2	0	12	0	8	7	0	0	0	0	0	25	6	8	29	5	0	8	10	11	3	5	9	5	4	3	0	0	0	0	0	
FHIT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
GATA5	0	0	0	0	0	0	37	0	0	0	0	0	5	0	0	92	0	0	0	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
GSTP1-1	0	0	24	0	0	0	49	57	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
GSTP1-2	0	4	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0	43	6	0	13	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
HIC1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	
IGSF4-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
IGSF4-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	37	100	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MGMT-a	0	0	73	0	19	0	0	0	67	50	100	100	0	71	0	100	0	0	16	24	6	10	17	0	0	0	0	0	0	0	
MGMT-b	0	3	0	0	0	11	0	0	0	0	0	2	0	0	5	3	0	3	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MLH1-a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	5	0	6	0	15	0	0	0	0	0	

EK 19 devam

	22TD	23TD	24TD	25TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	50TD	52TD	54TD	55TD	56TD	58TD	60TD	61TD	62TD	64TD	66BD	22ND	31ND	61ND	62ND	64ND	NW1	NW2	NW3		
MLH1-b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MSH6	12	0	0	15	0	6	0	0	0	0	0	6	6	0	0	0	6	84	22	3	10	10	1	0	0	0	0	0	0	
PAX5	28	16	25	15	0	22	0	0	0	0	0	0	9	3	15	19	0	3	0	3	0	3	0	6	5	0	3	0	0	
PAX6	0	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0	8	8	23	100	29	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PTEN-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0	
PTEN-2	0	4	0	12	0	0	40	0	0	0	0	4	1	0	0	3	4	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
PYCARD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
RARB-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RARB-2	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	12	0	0	0	43	0	6	0	6	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
RASSF1-a	21	56	17	12	13	35	15	73	0	23	0	52	25	19	0	69	0	13	0	13	0	43	36	0	0	0	0	0	0	0
RASSF1-b	18	27	22	14	28	23	0	51	0	21	0	36	21	14	0	75	0	4	0	4	0	24	23	0	0	0	0	0	0	0
RB1-a	2	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	100	0	100	0	100	100	100	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RB1-b	12	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
STK11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
THBS1	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
TIMP3	0	0	17	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	6	0	15	0	0	0	0
TP53	0	17	0	5	10	0	44	0	27	0	0	3	1	0	0	4	1	22	3	0	3	2	0	0	0	0	0	11	0	0
TP73-1	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TP73-2	0	0	15	3	0	0	0	0	0	0	0	2	4	26	0	0	4	0	5	3	6	7	3	0	0	0	3	0	0	0
VHL-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VHL-2	0	0	0	4	0	0	0	0	20	15	0	8	0	5	0	10	87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WT1	0	0	19	7	0	6	0	0	4	0	4	0	3	17	66	13	50	16	0	12	6	5	13	6	4	1	0	0	0	0

EK 20. Kategorize beta skorlan

	22TD	23TD	24TD	25TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	50TD	52TD	54TD	55TD	56TD	58TD	60TD	61TD	62TD	64TD	66BD	22ND	31ND	61ND	62ND	64ND	MM1	MM2	MM3
APC	1	3	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1	2	2	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ATM-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ATM-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BRCA1-1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BRCA1-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BRCA2-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BRCA2-2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CASP8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CD44-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CD44-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CDH13-1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CDH13-2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CDKN1B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CDKN2A-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CDKN2A-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CDKN2B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CHFR-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CHFR-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DAPK1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ESR1-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ESR1-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FHIT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GATA5	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GSTP1-1	1	1	1	1	1	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GSTP1-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HIC1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
IGSF4-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
IGSF4-2	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	4	4	1	3	1	4	2	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MGMT-a	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

EK 20 devam

	22TD	23TD	24TD	25TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	50TD	52TD	54TD	55TD	56TD	58TD	60TD	61TD	62TD	64TD	66BD	22ND	31ND	61ND	62ND	64ND	MM1	MM2	MM3	
MGMT-b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
MLH1-a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MLH1-b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MSH6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PAX5	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PAX6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PTEN-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PTEN-2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PYCARD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RARB-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RARB-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RASSF1-a	3	1	1	1	1	2	1	3	1	1	1	3	1	1	1	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
RASSF1-b	2	1	1	1	2	1	1	3	1	1	2	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RB1-a	1	1	1	1	1	1	1	1	4	4	1	4	1	4	1	4	4	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RB1-b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
STK11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
THBS1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TIMP3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TP53	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TP73-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TP73-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
VHL-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
VHL-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
WT1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

(1): beta skoru %0-%25; belirgin metilasyon yok. (2): beta skoru %26-%50; hafif düzeyde hipermetilasyon; (3):beta skoru %51-%74, orta şiddette hipermetilasyon; (4): beta skoru %75-100, şiddetli hipermetilasyon

EK 21. Aynı gene ait birden fazla bölge çalışılan durumlarda metilasyon bulguları

	22TD	23TD	24TD	25TD	26TD	29TD	30TD	31TD	32TD	50TD	52TD	54TD	55TD	56TD	58TD	60TD	61TD	62TD	64TD	66BD	22ND	31ND	61ND	62ND	64ND	NN1	NN2	NN3	
ATM
BRCA1	+/./+
BRCA2/+	.	.	+++./.
CD44
CDH13	.	+/.	+/+/++++/+	.	+++/+
CDKN2A/++++
ESR1/+	.	+++./.
GSTP1	+/.	++/.	+++/+	+/.
MGMT	.	.	++/.	+++./.
MLH1
PTEN/+
RARB	+/./+
RASSF1	.	++/+	.	./+	+/.	.	++/++	.	.	++/++	.	++/++	.	.	.	++/+++	+/.	+/.	.	.

EK 24. RT-qPCR verileriyle gerçekleştirilen ANOVA testlerine ilişkin p-değerleri

	BRCA1	BRCA2	CDKN2A	CDKN2B	TP53	TP73	GSTP1	TIMP3	CDH13	RASSF1	ATM	THBS1	PAX6	PAX5	PTEN	STK11	CASP8	CD44	ESR	RARB	MGMT	MLH1	MSH6
Menapoz durumu	0,892	0,710	0,124	0,638	0,366	0,458	0,276	0,922	0,350	0,808	0,938	0,953	0,614	0,944	0,136	0,348	0,483	0,420	0,437	0,238	0,249	0,215	0,661
Menarş yaşı	0,229	0,855	0,821	0,942	0,675	0,694	0,966	0,519	0,101	0,652	0,964	0,585	0,878	0,821	0,374	0,599	0,990	0,405	0,437	0,966	0,339	0,978	0,791
Gebelik Sayısı	0,261	0,648	0,619	0,148	0,631	0,412	0,971	0,305	0,341	0,884	0,918	0,401	0,499	0,487	<0,001	0,587	0,947	0,785	0,199	0,646	0,983	0,817	0,367
Ailede Meme Kanseri Hikayesi	0,838	0,178	0,892	0,142	0,947	0,576	0,478	0,186	0,522	0,768	0,206	0,239	0,739	0,428	0,414	0,922	0,357	0,340	0,395	0,645	0,744	0,064	0,838
Ailede Kanser Hikayesi	0,101	0,101	0,830	0,004	0,006	0,010	0,164	0,282	0,010	0,465	0,796	0,940	0,960	0,498	0,648	0,608	0,836	0,068	0,123	0,735	0,560	0,737	0,437
Histolojik Tip	0,165	0,469	0,435	0,708	0,630	0,545	0,567	0,277	0,181	0,661	0,560	0,520	0,883	0,437	0,393	0,697	0,723	0,371	0,019	0,505	0,713	0,209	0,460
Evre	0,108	0,136	0,754	0,129	0,269	0,309	0,313	0,903	0,998	0,680	0,988	0,926	0,508	0,504	0,626	0,397	0,850	0,920	0,904	0,946	0,650	0,841	0,495
Nükleer Grade	0,549	0,656	0,684	0,996	0,524	0,837	0,504	0,686	0,293	0,355	0,729	0,564	0,301	0,481	0,380	0,354	0,712	0,386	0,051	0,231	0,796	0,324	0,443
Mitotik Aktivite	0,265	0,557	0,912	0,376	0,672	0,358	0,903	0,586	0,264	0,495	0,833	0,478	0,392	0,643	0,158	0,072	0,817	0,295	0,046	0,547	0,905	0,422	0,497
T Grubu	0,274	0,529	0,253	0,686	0,148	0,270	0,366	0,313	0,393	0,713	0,069	0,535	0,839	0,796	0,152	0,901	0,760	0,246	0,442	0,620	0,523	0,401	0,679
Lenf Nodu invazyonu	0,419	0,091	0,067	0,228	0,349	0,571	0,122	0,720	0,262	0,561	0,935	0,451	0,713	0,570	0,398	0,827	0,973	0,351	0,894	0,670	0,169	0,357	0,091
Uzak Metastaz	0,033	0,016	1,000	0,109	0,132	0,082	0,449	0,935	0,844	0,509	0,792	0,679	0,591	0,350	0,515	0,328	0,405	0,033	0,995	0,776	0,496	0,828	0,251
Östrojen Reseptörü	0,007	0,068	0,400	0,130	0,667	0,218	0,391	0,069	0,136	0,068	0,310	0,534	0,560	0,563	0,130	0,097	0,311	0,006	0,004	0,080	0,787	0,315	0,185
HER2 Reseptörü	0,089	<0,001	0,427	0,205	0,648	0,368	0,151	0,839	0,199	0,750	0,922	0,452	0,383	0,911	0,852	0,772	0,614	0,033	0,662	0,705	0,651	0,610	0,146

p-değerinin 0,05'ten küçük olduğu durumlar kırmızı renk ile işaretlenmiştir.

EK 25. mMLPA-01 verileriyle gerçekleştirilen ANOVA testlerine ilişkin p değerleri

	TIMP3	APC	CDKN2A	MLH1	ATM	RARB	HIC1	CHFR	BRCA1	CASP8	PTEN	BRCA2	RASSF1	DAPK1	RASSF1	TP73	IGSF4	CDH13	GSTP1
Menopoz durumu	0,541	0,420	0,529	0,575	0,811	0,478	0,478	0,050	0,466	0,478	0,478	0,478	0,649	0,478	0,258	0,478	0,177	0,944	0,314
Menarş yaşı	0,304	0,983	0,543	0,247	0,015	0,073	0,932	0,932	0,057	0,073	0,073	0,375	0,886	0,989	0,822	0,989	0,989	0,901	0,971
Gebelik Sayısı	0,802	0,694	0,936	0,921	0,903	0,482	0,929	0,730	<0,001	0,929	0,929	0,482	0,496	0,929	0,751	0,929	0,846	0,892	0,852
Ailede Meme Kanseri Hikayesi	0,560	0,126	0,905	0,941	0,985	0,610	0,610	0,469	0,468	0,610	0,610	0,610	0,358	0,610	0,329	0,610	0,610	0,282	0,283
Ailede Kanser Hikayesi	0,455	0,110	0,377	0,852	0,484	0,026	0,657	0,529	0,528	0,657	0,657	0,026	0,263	0,026	0,062	0,026	0,026	0,022	0,076
Histolojik Tip	0,888	0,611	0,325	0,782	0,610	0,629	0,053	0,053	0,301	0,629	0,629	0,629	0,127	0,443	0,155	0,443	0,323	0,073	0,469
Evre	0,450	0,202	0,395	0,042	0,035	0,875	0,071	0,703	0,420	0,071	0,071	0,875	0,668	0,875	0,689	0,875	0,071	0,309	0,051
Nükleer Grade	0,600	0,822	0,678	0,734	0,804	0,743	0,743	0,548	0,546	0,743	0,743	0,743	0,773	0,252	0,789	0,252	0,743	0,390	0,723
Mitotik Aktivite	0,047	0,405	0,431	0,492	0,333	0,334	0,334	0,218	0,096	0,334	0,334	0,334	0,172	0,334	0,282	0,334	0,480	0,951	0,885
T Grubu	0,428	0,150	0,894	0,351	0,215	0,436	0,436	0,267	0,981	0,436	0,436	0,436	0,109	0,436	0,124	0,436	0,220	0,187	0,928
Lenf Nodu invazyonu	0,184	0,062	0,344	0,810	0,619	0,393	0,393	0,109	0,108	0,393	0,393	0,393	0,184	0,264	0,404	0,264	0,393	0,443	0,459
Uzak Metastaz	0,371	0,110	0,142	0,004	0,003	0,708	0,007	0,596	0,595	0,007	0,007	0,708	0,715	0,708	0,392	0,708	0,007	0,126	0,006
Östrojen Reseptörü	0,564	0,492	0,597	0,114	0,174	0,393	0,393	0,223	0,222	0,393	0,393	0,393	0,616	0,264	0,751	0,264	0,393	0,674	0,946
HER2 Reseptörü	0,863	0,033	0,388	0,203	0,153	0,134	0,134	0,362	0,361	0,134	0,134	0,134	0,971	0,521	0,962	0,521	0,134	0,100	0,279

p değerinin 0,05'ten küçük olduğu durumlar kırmızı renk ile işaretlenmiştir.

EK 26. mMLPA-02 verileriyle gerçekleştirilen ANOVA testlerine ilişkin p değerleri

Menapoz durumu	0,296	0,659	0,771	0,363	0,442	0,046	0,332	0,450	0,478	0,695	0,369	0,083	0,089	0,338	0,606	0,609	0,221	0,541	0,953	0,403	0,475	0,794	0,478	0,051	0,462	0,405	0,717	
Menarş yaşı	0,133	0,575	0,931	0,001	0,377	0,284	0,880	0,918	0,001	0,008	0,033	0,942	0,895	0,006	-0,001	0,575	0,545	0,080	0,475	0,972	0,989	0,977	0,989	0,964	0,990	0,149	0,873	
Gebelik Sayısı	0,382	0,954	0,137	0,553	0,562	0,669	0,567	0,577	0,692	0,898	0,136	0,924	0,834	0,838	0,716	0,953	0,996	0,023	0,065	0,782	0,931	0,942	0,929	0,904	0,887	0,636	0,620	
Ailede Meme Kanseri	0,651	0,492	0,776	0,306	0,678	0,422	0,360	0,779	0,136	0,117	0,393	0,517	0,428	0,155	0,013	0,510	0,381	0,172	0,582	0,098	0,054	0,034	0,056	0,471	0,129	0,608	0,421	
Hikayesi	0,057	0,800	0,008	0,487	0,746	0,878	0,371	0,920	0,763	0,331	0,788	0,128	0,491	0,678	0,521	0,332	0,447	<0,001	0,408	0,789	0,668	0,997	0,657	0,063	1,000	0,726	0,484	
Ailede Kanser	0,510	0,032	0,171	0,786	0,575	0,728	0,006	0,737	0,231	0,268	0,841	0,573	0,022	0,292	0,295	0,485	0,554	0,566	0,584	0,254	0,445	0,381	0,443	0,395	0,396	0,614	0,051	
Hikayesi	0,708	0,548	0,101	0,685	0,938	0,754	0,969	0,897	0,712	0,478	0,029	0,036	0,823	0,501	0,072	0,828	0,336	0,419	0,798	0,647	0,878	0,979	0,875	0,154	0,633	0,992	0,826	
Evte	0,722	0,669	0,381	0,510	0,654	0,127	0,341	0,828	0,196	0,135	0,414	0,772	0,485	0,488	0,029	0,321	0,412	0,490	0,625	0,091	0,027	0,012	0,027	0,873	0,069	0,129	0,717	
Nükleer Grade	0,475	0,405	0,425	0,330	0,156	0,653	0,832	0,433	0,802	0,548	0,882	0,600	0,318	0,467	0,519	0,757	0,763	0,740	0,174	0,641	0,336	0,315	0,334	0,647	0,523	0,332	0,741	
Mitotik Aktivite	0,871	0,242	0,249	0,726	0,756	0,861	0,957	0,150	0,392	0,097	0,721	0,572	0,417	0,491	0,298	0,786	0,556	0,938	0,663	0,283	0,432	0,712	0,436	0,373	0,344	0,560	0,827	
T Grubu	0,449	0,778	0,122	0,698	0,235	0,560	0,215	0,364	0,898	0,547	0,822	0,645	0,179	0,181	0,305	0,937	0,138	0,137	0,689	0,123	0,266	0,347	0,264	0,770	0,352	0,632	0,935	
Lenf Nodu invazyonu	0,628	0,647	0,118	0,627	0,666	0,383	0,714	0,975	0,609	0,246	0,374	0,003	0,562	0,707	0,990	0,348	0,126	0,699	0,447	0,633	0,706	0,981	0,708	0,020	0,560	0,847	0,810	
Uzak Metastaz	0,266	0,040	0,605	0,995	0,253	0,793	0,356	0,190	0,148	0,327	0,827	0,504	0,351	0,848	0,750	0,727	0,664	0,175	0,797	0,235	0,266	0,191	0,264	0,725	0,228	0,632	0,174	
Östrojen Reseptörü	0,471	0,215	0,643	0,606	0,459	0,737	0,866	0,718	0,456	0,092	0,262	0,133	0,318	0,016	0,290	0,742	0,640	0,287	0,188	0,430	0,518	0,829	0,521	0,271	0,670	0,910	0,438	
HER2 Reseptörü	p değerinin 0,05'ten küçük olduğu durumlar kırmızı renk ile işaretlenmiştir.																											

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: YALIN KILIÇ

EK 27. Özgeçmiş

TC Kimlik No / Pasaport No:	63286037634
Doğum Yılı:	1978
Yazışma Adresi :	1727 s. 9/1 Karşıyaka, 35530, İzmir. TR
Telefon :	0(505) 598 56 78
Faks :	-
e-posta :	yalin.kilic@deu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	Hacettepe	Tıp Fakültesi	Tıp	Lisans	2001

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	TR	İzmir	Sağlık Bilimleri Enst.	Araş. Gör.	2002-2007

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DiĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndeksle Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	0	
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	0	
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı	9	
	Tamamlanan	Devam Eden
Yüksek Lisans		

	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/ sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
Birincilik Ödülü, Onkoloji Araştırma Ödülleri	Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Derneği	2009
Prof. Dr. Bedii Gorbon Ödülü	Türkiye Kanserle Savaş Vakfı	2009
Akademi Ödülü	Prizma Moleküler Biyoloji Proje Yarışması	2006
Poster Presentation Award	VIII. National Breast Diseases Congress	2005
Bronz Madalya, II.Ulusal Fizik Olimpiyatları	TÜBİTAK	1994
I.basamak başarı ödülü, II.Ulusal Enformatik Olimpiyatları	TÜBİTAK	1994
I.basamak başarı ödülü, I.Ulusal Enformatik Olimpiyatları	TÜBİTAK	1993

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Kılıç Y, Çelebiler AÇ, Sakızlı M. Identification of the reference genes for normalization of Quantitative PCR Data in breast cancer. Turkish Journal of Biochemistry 2012; (henüz yayınlanmadı).
Celebiler CA, Sevinc A, Saydam S, Canda T, et al. Promoter methylation and expression changes of CDH1 and P16 genes in invasive breast cancer and adjacent normal breast tissue. Neoplasma 2010; 57(5):465-72.

Celebiler CA, Kilic Y, Saydam S, Canda T, et al. Predicting Invasive Phenotype with CDH1, CDH13, CD44 and TIMP3 Gene Expressions in Primary Breast Cancer. Cancer Science 2009;100(12):2341-5.

Celebiler CA, Saydam S, Alakavuklar M, Canda T, et al. A pilot study for human tumor/DNA banking: returned more questions than answers. Medical Oncology 2008;25(4):471-3.

Celebiler CA, Kilic Y, Saydam S, Canda T, et al. Correlation of clinical data and expression levels of six tumor suppressor genes in breast cancer. Cancer Research 2008;69(2):Supplement 1/1058.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Çavuşoğlu A, Saydam S, Alakavuklar M, Canda T, et al. Dokuz Eylül University Breast Tumor/DNA Banking: A pilot study. Turkish Journal of Cancer 2007;32(2):66-68.

Kılıç Y, Celebiler AÇ. Bir Mühendislik Yaklaşımı ile Aktarımsal Tıp. Meme Sağlığı Dergisi 2008;4(3):188-190.

Demirkan B, Kılıç Y, Cingöz S, Canda T, et al. Meme Kanserinde Her-2 Ekspresyonunun Saptanmasında İmmunhistokimya (Ihc), Floresan İn Situ Hibridizasyon (Fish), Kromojenik İn Situ Hibridizasyon (Cish) Ve Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (Rt-Pcr) Karşılaştırılması: Pilot Çalışma. Meme Sağlığı Dergisi 2007;3(ek):S01.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Celebiler CA, Kilic Y, Saydam S, Canda T, et al. Invazif Meme Kanserinde Tumor ve Komsu Normal Dokuda CDH1 ve P16 Genlerinin Promotor Metilasyon Durumları ve Ekspresyon Değişiklikleri. XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, 2009;S0.

Celebiler CA, Kilic Y, Saydam S, Canda T, et al. Predicting Invasive Phenotype with CDH1, CDH13, CD44 ve TIMP3 Gene Expressions in Primary Breast Cancer. 2008 ASCO-NCI-EORTC Annual Meeting on Molecular Markers, Hollywood, FL, 2008;A20.

Correlation of CDH1 and P16 genes methylation pattern with histological subtype and staging. 2008 ASCO-NCI-EORTC Annual Meeting on Molecular Markers, Hollywood, FL, 2008;A128.

Concordance of FISH and IHC in evaluation of HER2 levels in Breast Cancer. Workshop on "Emerging Topics in Human Functional Genomics and Proteomics", Antalya, 2006

Kilic Y, Cingoz S, Alungoz O, Canda T, et al. Meme Kanserinde HER2 Protoonkogeni ve HER2 Ölçümünde FISH Yönteminin IHC ile karşılaştırılması. I. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, Bursa, 2006,P08.

Cavusoglu AC, DEUMTG, Sakizli M, Guner G, et al. Meme Tümörü DNA, RNA ve Protein Bankasının ve Klinik Veri Tabanının Oluşturulması, IX. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, Manisa, 2005;P8.

EK 28. Tezden Yapılan Yayın

Çelebiler CA, Kılıç Y, Saydam S, Canda T, et al. Predicting invasive phenotype with CDH1, CDH13, CD44, and TIMP3 gene expression in primary breast cancer. *Cancer Sci* 2009; 100(12):2341-5

Predicting invasive phenotype with CDH1, CDH13, CD44, and TIMP3 gene expression in primary breast cancer

Aydan Celebiler (Cavusoglu),^{1,6} Yalın Kilic,² Serdar Saydam,³ Tulay Canda,⁴ Zuhul Başkan,⁵ Ali Ibrahim Sevinc³ and Meral Sakizli²

Departments of ¹Basic Oncology, ²Medical Biology and Genetics, ³General Surgery, ⁴Pathology, ⁵Medical Oncology, Dokuz Eylül University, İzmir, Türkiye

(Received May 3, 2009/Revised August 7, 2009; August 20, 2009/Accepted August 23, 2009/Online publication October 1, 2009)

We aimed to determine changes in the expression of the genes CDH1, CDH13, CD44, and TIMP3 to look for any relationship between them, HER2 and ESR1 expression at the RNA level, and the histopathological properties of tumors. We also analyzed the expression properties of double-negative (estrogen receptor [ER] and human epidermal growth factor receptor [HER2] both negative) breast tumors. Expression status was studied in fresh tissue at the mRNA level with quantitative PCR using hydrolysis probes. Sixty-two cancer patients and four normal controls were included in the study. When the tumor group was analyzed as a whole, the correlations of ESR1 with CDH1, CDH13, and TIMP3 were $P < 0.05$, $P < 0.005$, and $P < 0.005$, respectively. In ER-positive tumors, CDH1 and CDH13 were correlated directly ($P < 0.005$) when HER2 was correlated with CDH1, CDH13, and TIMP3 indirectly ($P < 0.005$, $P < 0.005$, and $P < 0.05$, respectively). CDH1 and CD44 had a strong indirect correlation ($P < 0.005$) in ER-negative tumors. There were significant differences in the expression levels of the CDH13, TIMP3, and CD44 genes ($P < 0.005$, $P < 0.005$, and $P < 0.05$, respectively) between the ER-positive and -negative groups. All four genes were found to be correlated with invasive properties in both ER-positive and -negative tumors. In double-negative tumor samples, only CD44 had a significant and strong correlation with stage, lymph node involvement, and metastasis ($P < 0.05$, $P < 0.005$, and $P < 0.05$, respectively). As a conclusion, a decrease in CDH1, CDH13, and TIMP3 expression levels with an increase in CD44 can be used as an indicator for invasion in both ER-positive and -negative breast tumors. In double-negative tumor tissues, CD44 can be considered a marker for aggressive properties. (*Cancer Sci* 2009; 100: 2341–2345)

Breast cancer is the most common type of cancer and the most important cause of mortality and morbidity related to cancer in industrial countries. Several molecular markers for predicting response to treatment and prognosis have been introduced. The status of estrogen receptor (ER), which is a member of the ER nuclear receptor superfamily, is one of the most declared markers. Transcription of ER and estrogen is regulated by complicated mechanisms. Two isoforms of the ER (ER- α and ER- β), which mediates the steroid hormone estrogen, are present; both have similar estrogen binding affinities but their expression is regulated separately.⁽¹⁾ The role of ER- β expression in breast cancer is not yet clear, but the presence of ER- α (ESR1) is used as a marker to indicate the potential effectiveness of endocrine treatment.⁽¹⁾ Almost one-third of breast tumors are ER negative at the time of diagnosis, and some others lose their receptors during tumor progression.⁽²⁾ Mostly ER-positive tumors have a better prognosis than ER-negative tumors. They can be successfully treated with hormone therapy like tamoxifen and aromatase inhibitors.^(3,4)

Epidemiological studies have shown that ER-positive tumors have a different risk profile compared with ER-negative tumors.⁽⁵⁾ Human epidermal growth factor receptor (HER2) is another important factor in treatment and prognosis. It is overexpressed in 15–25% of breast cancers and is associated with resistance to hormone treatment and bad prognosis.⁽⁶⁾

In breast cancer, it is the metastatic disease that causes mortality more than the primary tumor itself. For invasion and metastasis, breast tumor cells need a motile phenotype, which is a product of many abnormal gene interactions.^(7,8) The invasion and metastasis process begins when a carcinoma cell no longer needs stromal support for its mitogenic signals.⁽⁹⁾ Many factors, including adhesion molecules, extracellular matrix (ECM), destroying metalloproteinases (MMP), and tissue inhibitors of MMP (TIMP), have roles in this not completely clarified process.^(10,11)

Cadherins are transmembrane glycoproteins expressed on the epithelial cell surface that mediate intercellular Ca²⁺-dependent adhesion, which is important for maintaining normal tissue structure.⁽¹²⁾ Reduced expression of cadherin family members such as like CDH1 (E-cadherin) and CDH13 (H-cadherin) is observed in many tumors.^(13,14) Even though both genes are accepted as tumor-suppressor genes, the molecular mechanism is not yet clear.

CD44 is a cell surface membrane glycoprotein that acts in cell–cell and cell–matrix adhesions.⁽¹⁵⁾ Although the standard form is expressed the most, it has many isoforms formed by alternative splicing of the 10 exons of a single gene and post-translational modifications.⁽¹⁶⁾ As a cell surface receptor, it mediates many ligands, including hyaluronic acid, fibronectin, and osteopontin.^(17–19) Studies analyzing the correlation of histopathological features and CD44 expression have produced conflicting results.^(20–22) Also, both tumor suppressive and tumor progression-promoting roles have been suggested in breast cancer patients.^(23,24)

TIMP are natural molecules that inhibit proteolytic activity of MMP.⁽²⁵⁾ The imbalance between MMP and TIMP may affect cancer invasion and metastasis, and consequently the clinical course of the patient.⁽²⁶⁾ TIMP-3, which is tightly bonded to the matrix via heparan sulfate,⁽²⁷⁾ has been shown to have roles in invasion, apoptosis, and cellular growth in *in vitro* studies.^(28–31) It has a tumor suppressor role in many malignancies.⁽³²⁾

No *in vivo* interaction of the genes CDH1, CDH13, CD44, and TIMP3 have been evidenced yet. The present study aims to display the expression changes of these genes in breast cancer. The relationship between the RNA levels of the genes CDH1, CDH13, CD44, and TIMP3 together with HER2 and ESR1 and with histopathological features was studied. Also, expression

⁶To whom correspondence should be addressed.
E-mail: aydancelibiler@gmail.com

patterns in double-negative breast tumors and differences in the patterns according to ER and HER2 status were characterized.

Material and Methods

Patients and tumors. Breast tumors and adjacent non-malignant tissues from the resection margin were obtained from the Dokuz Eylül Breast Tumor Biobank under permission of the local clinical and laboratory research ethical council for analysis of patient samples. All of the breast tissue samples were collected from patients who had neither chemotherapy nor radiotherapy before operation. Primary breast carcinomas were frozen in either liquid nitrogen or on dry ice within 20 min following devascularization, and were stored at -80°C . Frozen sections were cut from primary breast carcinoma specimens and stained with hematoxylin–eosin to confirm tumor content. Specimens in which at least 70% of the cells were carcinoma cells were utilized in this study. The Elston–Ellis modification of the Scarff–Bloom–Richardson grading system (Nottingham grading system) is based on a microscopic evaluation of morphological and cytological features of tumor cells.⁽³³⁾ The clinical stage of the disease was determined according to the American Joint Committee on Cancer staging manual.⁽³⁴⁾ Tumour size (≤ 2 cm and > 2 cm) and status of involved lymph nodes (none and one or more nodes) were evaluated separately. ER and HER2 receptor status were assessed on histological sections by standard immunohistochemistry (IHC). IHC was scored qualitatively exploiting the semiquantitative results of ER and HER2 to accept staining of 10% or more and 3+ as positive, respectively. Normal control breast tissues were obtained from breast reduction surgeries of otherwise healthy patients. All of the macroscopic and microscopic examinations were carried out by the same pathologist.

DNA and RNA extraction. DNA and RNA isolations were done using fresh tissue that was immediately analyzed by the pathologist after surgical resection. Approximately 10–20 μg of DNA was isolated from 1 mg of tissue pieces using the spin column technique (genomic DNA extraction, Mini-Tissue; RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) after mechanical homogenization (micropestle made with polypropylene) of the tissue. DNA concentration and purity was measured with an UV spectrophotometer (UV-3600; Shimadzu, Kyoto, Japan).

Quantitative PCR. The cDNA was synthesized using 0.2 μg random primers and 200 U moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Revertaid First Strand; Fermentas, Vilnius, Lithuania) DNA polymerase at 42°C for 90 min.

Specific primers and hydrolysis probes for *CDH1*, *CDH13*, *CD44*, *TIMP3*, *ESR1*, *HER2*, *HER4*, and the housekeeping genes *ACTB* (β -actin), *B2M* (β -2-microglobulin), *RPL13A* (ribosomal protein L13a), and *PUM1* (homolog of Pumilio, Drosophila) were designed using a universal probe library database (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (Table 1), and quantitative

PCR (qPCR) was set up on a 96-well plate (Mx3000P; Stratagene, La Jolla, CA, USA).

A calibrator RNA of a pool of human RNA (Universal Human Normal Tissue RNA; BioTaq, Boline, UK) was used for optimization of primer and probe combinations and plotting standard curves. Universal RNA was converted to its cDNA using random hexamer primers at once and diluted to a pool to minimize any experimental variations. In calculations of standard curves, at least five different dilutions of the calibrator cDNA were used, each in triplicate.

qPCR reactions were set up in a 20- μL volume with 10 μL 2 \times Taqman master mix (RBC Bioscience), 0.2 μL (200 nM) of each primer, and 0.2 μL (100 nM) probe starting with 2 μL cDNA template. The reaction profile was 50 cycles of 30 s at 95°C , 40 s at 59°C , and 20 s at 72°C after 10 min of initial denaturation and hot-start activation. Fluorescence readings was done at the end of the annealing step. The formula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ was used to calculate relative quantitation values from data of an individual sample to normalize it with its housekeeping gene for comparison with normal tissue to show fold differences in expression.⁽³⁵⁾

Intra-run and inter-run coefficients of variation (CV) were calculated for the whole experiment. When PCR were set up in parties of 96 at once, a duplicate of PUM1 at two different concentrations of universal cDNA (10 and 0.1 ng/ μL) was repeated in each plate to standardize inter-run differences.

Statistics. SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, USA) was used in statistical analysis to do: Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk tests for normal distribution analysis of data groups; Kruskal–Wallis and Mann–Whitney *U*-tests for searching any statistical difference between groups, clinical parameters, and gene expression levels; and Spearman and Pearson correlation analysis for any relationships in the expression patterns of genes. Log and $-1/\log$ of data were used in the calculations for positive and negative data, respectively.

Results

Individuals. Sixty-six samples from 66 individuals grouped as four normal (ages 30–41 years; mean 36 years; median 36.5 years) and 62 invasive tumors (ages 26–81 years; mean 53.2 years; median 51 years) were included in the study. The histopathological specifications and ER status of the tumors are shown in Table 2.

Reliability of qRT-PCR. The absorbance ratios of 260/280 nm for the RNA isolated from tissue samples were 1.95–2.12 (± 0.03). Intra-run CV% for all qRT-PCR reactions were 0.0342 and 0.042, and inter-run CV% were 0.042 and 0.024 for 10 ng and 1 ng initial concentrations, respectively.

Efficiency, slope, and RSq values for reference and target genes were calculated by the MxPro analysis software of the Stratagene Mx3000P device and are shown in Table 3. The RSq

Table 1. Primer and probe list for quantitative PCR

Gene	GenBank/EMBL name	Primer 1 (forward)	Primer 2 (reverse)	UPL probe number
<i>CDH1</i>	ENSG0000039068	gccgagagctacacgttca	gaccggtgcaatcttcaa	80
<i>CDH13</i>	ENSG0000140945	gcgtgtacactgctctctcc	aaagtcccagtgcccgtag	59
<i>CD44</i>	ENSG0000026508	tggatcaggcattgatgatg	gtcaaaagcccgtggtgt	67
<i>TIMP3</i>	ENSG0000100234	ctgtgcaactctctgagag	ggcaggtagtagcaggacttg	14
<i>ESR</i>	ENSG0000091831	ttactgaccaactctgcaga	atcatggagggtcaaatcca	24
<i>HER2</i>	ENSG0000141736	gggaaacctggaactcact	ccttcacctctggata	4
<i>RPL13A</i>	NM_012423	gaggccctaccacttcc	aacaccttgagacggtccag	28
<i>B2M</i>	NM_004048	taggagggcgtggcaacttag	cttatgcagcgttaactcttaacaa	32
<i>ACTB</i>	NM_001101	ccaaccgcgagaagatga	ccagagcgtacagggatag	64
<i>PUM1</i>	NM_001020658	agtgggggactagcgcttag	gtttcatcactgtctcatcc	22

UPL, universal probe library.

Table 2. Histopathological features of the patients

Characteristics	ER negative		ER positive		Total	
	n	%‡	n	%‡	n	%§
Age at diagnosis (years)						
≤50	9	50	20	45.5	29	46.8
50<	9	50	24	54.5	33	53.2
Stage						
1	3	16.7	12	27.3	15	24.2
2	8	44.4	12	27.3	20	32.3
3	4	22.2	15	34.1	19	30.6
4	3	16.7	5	11.4	8	12.9
Nuclear grade						
1	1	5.6	5	11.4	6	9.7
2	6	33.3	21	47.7	27	43.6
3	10	55.6	18	40.9	28	45.2
Unknown	1	5.6	–	–	1	1.6
Histological grade						
1	0	–	11	25	11	17.7
2	7	38.9	12	27.3	19	30.6
3	3	16.7	2	4.5	5	8.1
Unknown	8	44.4	9	20.5	17	27.4
Mitotic activity						
1	6	33.3	21	47.7	27	43.6
2	4	22.2	14	31.8	18	29
3	7	38.9	7	15.9	14	22.6
Unknown	1	5.6	2	4.5	3	4.8
Tubular differentiation						
1	0	–	4	9.1	4	6.5
2	4	22.2	20	45.5	24	38.8
3	11	61.1	20	45.5	31	50
Unknown	3	16.7	–	–	3	4.8
Tumor size						
≤20 mm	5	27.8	22	50	27	43.6
>20 mm	11	61.1	21	47.7	32	51.6
Tx	2	11.1	1	2.3	3	4.8
Nodal involvement						
No	9	50	18	40.9	27	43.6
N positive	9	50	26	59.1	35	56.5
Metastasis						
Negative	15	83.3	39	88.6	54	87.1
Positive	3	16.7	5	11.4	8	12.9
HER2+						
Negative	8	44.4	6	13.6	14	22.6
Positive	10	55.6	36	81.8	46	74.2
Unknown	–	–	2	4.5	2	3.2

†Her2 positive, 3+ expression by immunostatin; ‡percentage in the group; §percentage in the total number of patients. Tx, unknown tumor size.

Table 3. Gene amplification efficiencies

Gene	Efficiency (%)	Slope	RSq†
CDH1	100.4	3.313	0.997
CDH13	99.8	3.326	0.997
CD44	100.4	3.312	0.999
TIMP3	99.4	3.337	0.999
ESR1	101	3.299	0.999
HER2	97.6	3.380	0.998
RPL13A	101	3.288	0.998
B2M	86.1	3.717	0.999
ACTB	100.2	3.318	1.000
PUM1	101.4	3.327	0.996

†RSq value is a calculated assessment of the fit of the standard curve to the data points plotted.

value is a calculated assessment of the fit of the standard curve to the data points plotted.

In the whole group, the PUM1 gene was ranked as the most stable gene (stability score 0.229; standard error 0.104) and preferred for use in normalization.

Gene expression data. There were strong and significant correlations between the IHC and qRT-PCR results for ER and HER2 ($r = 786$, $P = 0.000$ and $r = 710$, $P = 0.000$, respectively).

In the whole tumor group, the levels of ESR1 and CDH1, CDH13, and TIMP3 had significant correlations ($r = 256$, $P = 0.021$; $r = 566$, $P = 0.000$; and $r = 409$, $P = 0.000$, respectively).

In ER-positive tumors, the observed correlation was direct between the expression of CDH1 and CDH13 ($r = 424$, $P = 0.004$), but indirect between HER2 and CDH1, CDH13, and TIMP3 ($r = -510$, $P = 0.000$; $r = -423$, $P = 0.004$; and $r = -386$, $P = 0.01$, respectively). There was an indirect correlation between CDH1 and CD44 in ER-negative tumors ($r = -666$, $P = 0.003$).

There were significant differences in the expression of CDH13, TIMP3, and CD44 between the ER-positive and ER-negative groups at the levels of 0.001, 0.001, and 0.05, respectively (Fig. 1). The expression of these genes was not significantly different when grouped as HER2-positive and HER2-negative.

Table 4 shows the correlation between gene expression levels and histopathological features, when grouped according to ER status. In double-negative tumor samples, CD44 gene expression levels had strong and significant correlations with stage, nodal involvement, and metastasis ($r = 848$, $P = 0.008$; $r = 756$, $P = 0.003$; and $r = 845$, $P = 0.008$, respectively).

Discussion

This is one of the exceptional studies in the literature in which intra- and inter-study CV are calculated to show the reliability of the results of qRT-PCR experiments. Both CV were below 0.005, indicating the analytical validity. The normalization step in the analysis of RNA level expression studies has a direct effect on the experimental results. Incorrect assignment of the unstable reference gene may lead to wrong decisions based on these deflected results.⁽³⁶⁾ Instead of the influential B2M and ACTB genes, the PUM1 gene was calculated as the most stable gene and used for the purpose of normalization in our study.⁽³⁷⁾ Comparison with normal breast tissue is a very simple and confident method to show the fold difference in expression.

Breast cancer has a heterogeneous nature and patients with similar histopathological diagnosis can have different clinical prognosis and respond differently to the same therapy.⁽³⁸⁾ Improving the clinical management of breast cancer is only possible with more data on the biological behavior of the tumor. In the present study, genes related with metastatic and invasive properties are compared with the conventional histopathological features of the tumor, which specifies the biological behavior of the tumor.

The role of CD44 in the regulation of metastasis and invasion in tumorigenesis is controversial. Some authors suggest its role in tumor progression and metastasis^(39–42) while others suggest that it inhibits these courses.^(43,44) It is highly possible that different variants of this gene and post-translational modifications of the product may lead to different conclusions in studies with different methods. It was shown that transfection with antisense CD44 inhibits tumor cell growth and metastasis;⁽⁴⁵⁾ and expression levels of the standard form of CD44 and its variants are increased in metastatic breast carcinoma.⁽⁴⁶⁾ The idea of expedition to invasion^(47,48) is also supported by our data, which reflects the standard form of CD44. This effect is more obvious

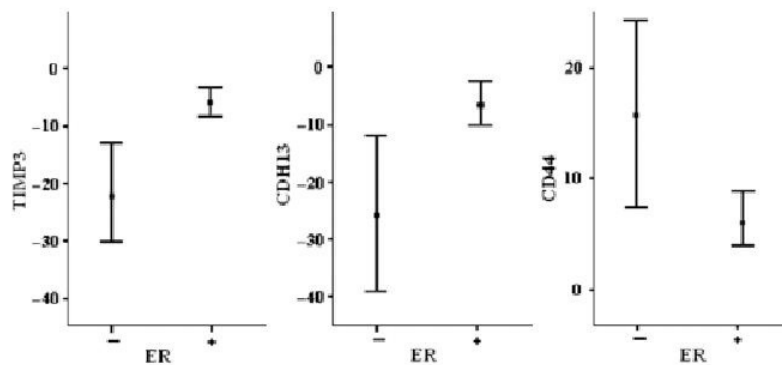


Fig. 1. CDH13, TIMP3, and CD44 gene expressions versus estrogen receptor (ER) status (mean \pm SE).

Table 4. Correlation between gene expression and histopathological features of the tumor

Characteristics	CDH1		CDH13		CD44		TIMP3		ESR1		HER2	
	ER ⁺	ER ⁻	ER ⁺	ER ⁻	ER ⁺	ER ⁻	ER ⁺	ER ⁻	ER ⁺	ER ⁻	ER ⁺	ER ⁻
Stage	↓↓	↓	-	-	-	↑	↓	↓	-	-	↑↑	-
Nuclear grade	↓↓	-	-	-	↑	-	-	-	↓↓	↓	↑	-
Histological grade	↓	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-
Tubular differentiation	↓	-	↓	↓	-	-	↓↓	-	-	-	-	-
Tumor size	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nodal involvement	↓↓	↓	↓	-	↑	↑↑	↓↓	↓↓	-	-	↑↑	-
Metastasis	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	↑	-

↓, 0.05 level; ↓↓, 0.001 level significance indirect; ↑, 0.05 level; ↑↑, 0.001 level significance direct.

in ER-negative tumors compared with ER-positive tumors. The cell adhesion mechanism for binding of tumor cells to the ECM and basal membrane has an important role in tumor invasion. Migration via ECM is favoured in the CD44 and hyaluronic acid interaction for degradation of basal membrane. Upregulation of the standard form of CD44 in tumors may lead to more aggressive and spreading cells. In double-negative (ER and HER2 negative) tumor samples, correlation of CD44 with stage, nodal involvement, and metastasis supports this idea. In more aggressive ER-positive tumors, a similar situation is observed revealing that CD44 is not only dependent on estrogen.

Decreased expression of CDH1 is one of the most prominent changes in cancer, signifying its tumor suppressor role.⁽⁴⁹⁾ However, CDH1 expression changes are not related to advanced-grade ER-negative and metastatic individuals. Our data shows that CDH1 and ESR1 levels are related and suggests a correlation between decreased levels of the CDH1 gene with impaired tumor phenotype and ESR1 expression. Similar situations are observed in CDH13 expression changes. Poor differentiation is shown to be associated with decreased levels of CDH13 in ER-negative tumor samples.

Our results indicate higher TIMP3 RNA levels in steroid receptor-positive samples. We found a decrease in the levels of TIMP3 RNA when tumor cells gain invasive properties and lose their differentiated state. A negative correlation between TIMP3 and HER2 also suggests these circumstances.

The patterns of gene expression in ER-positive and ER-negative tumors and their relationships with HER2 and ESR1 levels may have great importance in comprehending molecular pathogenesis, and should be verified in large sample groups. To guess

tumor behavior, using multiple markers is no doubt better than a single marker, minimizing possible errors.

As a conclusion, decreased CDH1, CDH13, and TIMP3 with increased CD44 gene expression levels can be used as an indicator for invasion in both ER-positive and ER-negative breast tumors. In double-negative tumor tissues, CD44 can be considered a marker for aggressive properties. However, additional assays in a larger series of patients with long follow up will be necessary to confirm these results of gene expressions in ER-positive and ER-negative tumors and their relationship with HER2 and ESR1.

Author Contribution

ACC conceived the statistical analysis of data from molecular genetic studies designed by ACC with MS and performed by ACC and YK. SS and AIS helped in selecting patients and supplying tissues. TC carried out pathological evaluations and ZB maintained the coordination of clinical data of the patients. The manuscript was written by ACC and YK, and read and approved by all authors.

Funding

This study is supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) and Dokuz Eylul University.

Disclosure Statement

The authors declare that they have no conflict of interests.

References

1 Shao W, Brown M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res* 2004; **6**: 39-52.

2 Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1998; **339**: 974-84.
3 Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; **365**: 1687-717.

- 4 Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR *et al*. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) Multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 5108–16.
- 5 Colditz GA, Rosner BA, Chen WY, Holmes MD, Hankinson SE. Risk factors for breast cancer according to estrogen and progesterone receptor status. *J Natl Cancer Inst* 2004; **96**: 218–28.
- 6 Francis G, Beadle G, Thomas S, Mengersen K, Stein S. Evaluation of oestrogen and progesterone receptor status in HER-2 positive breast carcinomas and correlation with outcome. *Pathology* 2006; **38**: 391–8.
- 7 Entschladen F, Drell TL IV, Lang K, Joseph J, Zaenker KS. Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters. *Lancet Oncol* 2004; **5**: 254–8.
- 8 Eccles SA. Targeting key steps in metastatic tumour progression. *Curr Opin Genet Dev* 2005; **15**: 77–86.
- 9 Keen JC, Davidson NE. The biology of breast carcinoma. *Cancer* 2003; **97**: 825–33.
- 10 Vernon AE, LaBonne C. Tumor metastasis: a new twist on epithelial-mesenchymal transitions. *Curr Biol* 2004; **14**: R719–21.
- 11 Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifaceted proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; **49**: 187–98.
- 12 Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 619–27.
- 13 Bex G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer carcinogenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001; **3**: 289–93.
- 14 Toyooka KO, Toyooka S, Virmani AK *et al*. Loss of expression and aberrant methylation of the CDH13 (H-cadherin) gene in breast and lung carcinomas. *Cancer Res* 2001; **61**: 4556–60.
- 15 Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002; **39**: 527–79.
- 16 Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44 structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997; **71**: 241–319.
- 17 Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; **61**: 1303–13.
- 18 Jalkanen S, Jalkanen M. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 1992; **116**: 817–25.
- 19 Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor–ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 1996; **271**: 509–12.
- 20 Gotte M, Yip GW. Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Res* 2006; **66**: 10233–7.
- 21 Morris SF, O'Hanlon DM, McLaughlin R, McHale T, Connolly GE, Given HF. The prognostic significance of CD44s and CD44v6 expression in stage two breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Surg Oncol* 2001; **27**: 527–31.
- 22 Auvinen P, Tammi R, Tammi M, Johansson R, Kosma VM. Expression of CD44s, CD44v3 and CD44v6 in benign and malignant breast lesions: correlation and colocalization with hyaluronan. *Histopathology* 2005; **47**: 420–8.
- 23 Watanabe O, Kinoshita J, Shimizu T *et al*. Expression of a CD44 variant and VEGF-C and the implications for lymphatic metastasis and long-term prognosis of human breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; **24**: 75–82.
- 24 Diaz LK, Zhou X, Wright ET *et al*. CD44 expression is associated with increased survival in node-negative invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 3309–14.
- 25 Fassina G, Ferrari N, Brigati C *et al*. Tissue inhibitors of metalloproteases: regulation and biological activities. *Clin Exp Metastasis* 2000; **18**: 111–20.
- 26 Freije J, Balbin M, Pendas AM, Sanchez LM, Puente XS, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases and tumor progression. *Adv Exp Med Biol* 2003; **532**: 91–107.
- 27 Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF Jr. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 2000; **275**: 31226–32.
- 28 Baker AH, George SJ, Zaltsman AB, Murphy G, Newby AC. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer* 1999; **79**: 1347–55.
- 29 Bond M, Murphy G, Bennett MR, Newby AC, Baker AH. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway. *J Biol Chem* 2002; **277**: 13787–95.
- 30 Leco KJ, Waterhouse P, Sanchez OH *et al*. Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest* 2001; **108**: 817–29.
- 31 Ahonen M, Ala-Aho R, Baker AH *et al*. Antitumor activity and bystander effect of adenovirally delivered tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Mol Ther* 2002; **5**: 705–15.
- 32 Loding WT, Reisman D. Inhibition of the putative tumor suppressor gene TIMP-3 by tumor-derived p53 mutants and wild type p53. *Oncogene* 1999; **18**: 7608–15.
- 33 Simpson JF, Gray R, Dressler LG *et al*. Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 2059–69.
- 34 Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: Working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin* 2006; **56**: 37–47.
- 35 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{–(Delta Delta C(T))} method. *Methods* 2001; **25**: 402–8.
- 36 Jacques BK, Roelofs RW, Giesendorf BA *et al*. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 2005; **85**: 154–9.
- 37 Lyng MB, Laenkholm AV, Pallisgaard N, Ditzel HJ. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. *BMC Cancer* 2008; **8**: 20.
- 38 Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *The Oncologist* 2004; **9**: 361–77.
- 39 Kurozumi K, Nakao K, Nishida T, Nakahara M, Ogino N, Tsujimoto M. Significance of biologic aggressiveness and proliferating activity in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 1998; **22**: 1237–42.
- 40 de Alava E, Panizo A, Sola I, Rodriguez-Rubio FI, Pardo-Mindan FJ. CD44v6 expression is related to progression in renal epithelial tumours. *Histopathology* 1998; **33**: 39–45.
- 41 Bankfalvi A, Terpe HJ, Breukelmann D *et al*. Immunophenotypic and prognostic analysis of E-cadherin and β -catenin expression during breast carcinogenesis and tumour progression: a comparative study with CD44. *Histopathology* 1999; **34**: 25–34.
- 42 Kanke M, Fujii M, Kameyama K *et al*. Role of CD44 variant exon 6 in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; **126**: 1217–23.
- 43 Sillanpää S, Anttila MA, Voutilainen K *et al*. CD44 expression indicates favorable prognosis in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2003; **9** (14): 5318–24.
- 44 Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I *et al*. A multivariate analysis of adhesion molecules expression in assessment of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2007; **95**: 652–62.
- 45 Yu Q, Toole BP, Stamenkovic I. Induction of apoptosis of metastatic mammary carcinoma cells in vivo by disruption of tumor cell surface CD44 function. *J Exp Med* 1997; **186**: 1985–96.
- 46 Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44, structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997; **71**: 241–319.
- 47 Lopez JI, Camenisch TD, Stevens MV, Sands BJ, McDonald J, Schroeder JA. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res* 2005; **65**: 6755–63.
- 48 Choi SH, Takahashi K, Eto H, Yoon SS, Tanabe KK. CD44s expression in human colon carcinomas influences growth of liver metastases. *Int J Cancer* 2000; **85**: 523–6.
- 49 Gamallo C, Palacios J, Suarez A *et al*. Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol* 1993; **142**: 987–93.

